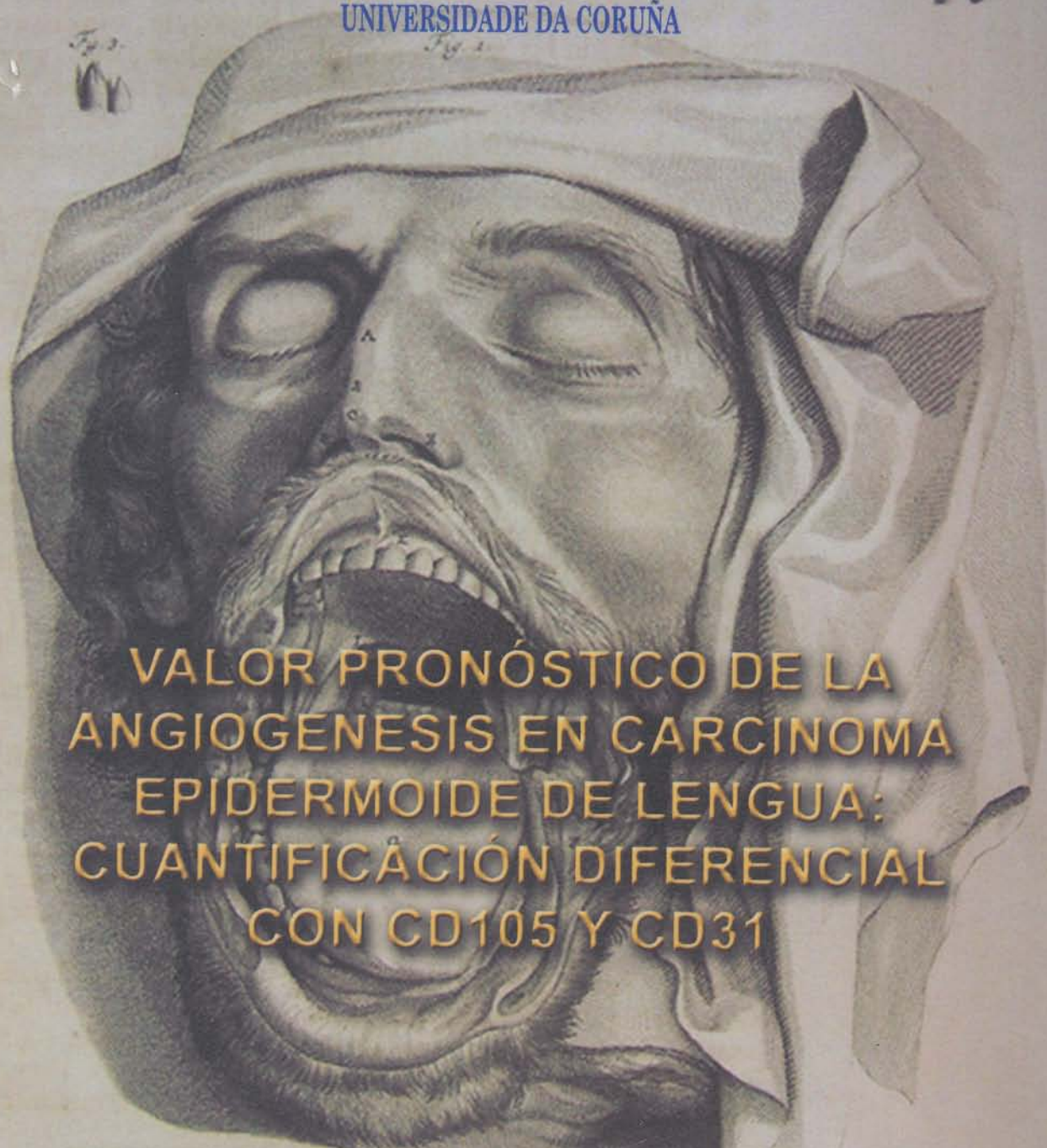


UNIVERSIDADE DA CORUÑA



VALOR PRONÓSTICO DE LA  
ANGIOGENESIS EN CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE DE LENGUA:  
CUANTIFICACIÓN DIFERENCIAL  
CON CD105 Y CD31

ALVARO GARCIA-ROZADO GONZALEZ



LA CORUÑA, 2007



2

**Departamento de Medicina**

UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA

---

**VALOR PRONÓSTICO DE LA  
ANGIOGENESIS EN CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE DE LENGUA:  
CUANTIFICACIÓN DIFERENCIAL  
CON CD105 Y CD31**

---

**DOCTORANDO**

**ALVARO GARCIA-ROZADO GONZALEZ**

**DIRECTORES**

DR. MARIO MARCOS FERNANDEZ FERNANDEZ

DR. JOSE LUIS LOPEZ-CEDRUN CEMBRANOS

**LA CORUÑA, 2007**



**A mi mujer, Marta**

**A mi hijo, Alejandro**

*Por todo ese tiempo que les he privado  
en la realización de este trabajo...  
y que ya no podremos recuperar.*

## Agradecimientos:

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a mi formación como persona y como profesional. Son muchas más de las expresadas en estas líneas, por lo que hago extensiva mi gratitud y reconocimiento a aquellas que no se encuentren directamente mencionadas.

A mis padres, Roberto y María Antonia, por no haber escatimado esfuerzo alguno para inculcarme los valores básicos de la vida, y hacerme ver que el esfuerzo continuo y humilde es la principal fuente de conocimientos y la mejor forma de encarar los problemas que la vida te plantea.

A mis profesores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, que me transmitieron sus conocimientos y sentaron las bases para que me pudiera desarrollar en las ciencias médicas.

Al Prof. José Pericot, Jefe del Servicio de Cirugía Maxilofacial de la Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge, donde realicé mi formación como especialista. Su vasto conocimiento es mucho menor que su riqueza personal. Suyos, y del resto de componentes del Servicio, han sido los primeros conocimientos que me han permitido cimentar una base a partir de la cual poder desarrollarme en el apasionante campo de la Cirugía Oral y Maxilofacial.

Al Dr. José Luis López-Cedrún, por haber sabido confiar en mí y haber acometido el difícil reto de encabezar un equipo de trabajo para el desarrollo de la Cirugía Oral y Maxilofacial en la comunidad gallega.

A todo ese equipo de trabajo, por haber sido un constante apoyo en los problemas que nuestra cirugía plantea.

A los Dres. Mario Fernández y Jesús Del Pozo, por ser mis amigos y verdaderos artífices de que se pusiera en marcha este proyecto.



A todas las personas que con ilusión han contribuido a desarrollar esta línea de investigación.

A todos los profesionales que han participado en el tratamiento de estos pacientes.

A mis pacientes, todos sin excepción, porque de todos ellos espero haber aprendido algo, y seguir aprendiendo.



UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA

**D. Mario Marcos Fernández Fernández**, Doctor en Medicina y Cirugía, Universidad de La Coruña

HACE CONSTAR:

Que el Licenciado en Medicina y Cirugía **D. Alvaro García-Rozado González** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado:

***"Valor pronóstico de la angiogenesis en carcinoma epidermoide de lengua: cuantificación diferencial con CD105 y CD31."***

Revisado el trabajo, apruebo sea presentado para su exposición y defensa para optar al grado de Doctor.

A Coruña, a 9 de Enero de 2007.

FDO: Dr. Mario Marcos Fernández Fernández





UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA

**D. José Luis López-Cedrún Cembranos**, Doctor en Medicina y Cirugía

HACE CONSTAR:

Que el Licenciado en Medicina y Cirugía **D. Alvaro García-Rozado González** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado:

***"Valor pronóstico de la angiogenesis en carcinoma epidermoide de lengua: cuantificación diferencial con CD105 y CD31."***

Revisado el trabajo, apruebo sea presentado para su exposición y defensa para optar al grado de Doctor.

A Coruña, a 9 de Enero de 2007.

FDO: Dr. José Luis López-Cedrún Cembranos

# INDICE

<b>CAPITULO I: INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Cáncer oral y orofaríngeo</b>	<b>13</b>
Anatomía aplicada de la cavidad oral	15
Función de la cavidad oral	18
Epidemiología del cáncer de cavidad oral	19
Etiología del cáncer oral	22
Estrategias preventivas	22
Histopatología del cáncer oral	23
Localización del cáncer de cavidad oral y orofaringe	24
Evaluación del paciente de cáncer oral y orofaríngeo	26
Estadíaaje tumoral	32
Factores que afectan al tratamiento. Objetivos terapéuticos	35
Planificación terapéutica	38
Seguimiento post-tratamiento	41
Resultados	41
Factores pronósticos en cáncer oral y orofaríngeo	43
<b>1.2. Cáncer de lengua</b>	<b>50</b>
Introducción	50



<b>Perspectiva histórica</b>	<b>50</b>
<b>Embriología</b>	<b>52</b>
<b>Consideraciones anatómo-fisiológicas de la lengua</b>	<b>52</b>
<b>La mucosa lingual</b>	<b>61</b>
<b>Epidemiología del cáncer de lengua</b>	<b>62</b>
<b>Factores etiológicos</b>	<b>63</b>
<b>Lesiones precancerosas</b>	<b>66</b>
<b>Clínica</b>	<b>67</b>
<b>Diagnóstico</b>	<b>74</b>
<b>Tratamiento actual</b>	<b>76</b>
<b>Pronóstico</b>	<b>77</b>
<b>1.3. Carcinoma epidermoide</b>	<b>80</b>
<b>Oncobiología del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello</b>	<b>80</b>
<b>Histología</b>	<b>90</b>
<b>Estado actual del tema</b>	<b>93</b>
<b>1.4. Angiogénesis</b>	<b>96</b>
<b>Introducción</b>	<b>96</b>
<b>Evolución histórica</b>	<b>100</b>
<b>Angiogénesis neoplásica</b>	<b>106</b>
<b>Utilidad clínica de la angiogénesis</b>	<b>115</b>
<b>Terapia antiangiogénica</b>	<b>122</b>
<b>Angiogénesis y cáncer oral</b>	<b>130</b>
<b>Valor pronóstico de la angiogénesis en cáncer oral</b>	<b>133</b>
<b>1.5. Endoglin</b>	<b>138</b>
<b>Descripción</b>	<b>138</b>
<b>Origen</b>	<b>140</b>

<b>Conocimientos actuales</b>	<b>140</b>
<b>Expresión tumoral del CD105</b>	<b>142</b>
<b>Forma soluble de endoglin (sCD105)</b>	<b>147</b>
<b>Implicaciones funcionales en la angiogénesis, desarrollo vascular y progresión del cáncer</b>	<b>148</b>
<b>Implicaciones clínicas</b>	<b>151</b>
<b>Perspectivas futuras</b>	<b>153</b>
<b>El CD31</b>	<b>154</b>
 <b>CAPITULO II: JUSTIFICACION Y OBJETIVOS</b>	 <b>156</b>
<b>Diseño general del estudio: Justificación</b>	<b>162</b>
 <b>CAPITULO III: MATERIAL Y METODOS</b>	 <b>164</b>
<b>3.1. Material: Datos generales</b>	<b>165</b>
<b>Descripción de la muestra</b>	<b>165</b>
<b>Cohorte de pacientes</b>	<b>169</b>
<b>Estudio anatomopatológico</b>	<b>171</b>
<b>3.2. Descripción del estudio</b>	<b>172</b>
<b>Cuantificación de la angiogénesis tumoral</b>	<b>172</b>
<b>Contaje vascular en la muestra</b>	<b>180</b>
<b>Metodología del estudio clínico</b>	<b>182</b>
<b>Metodología del estudio histológico e inmunológico</b>	<b>187</b>
<b>3.3. Método estadístico</b>	<b>188</b>
 <b>CAPITULO IV: RESULTADOS</b>	 <b>189</b>
<b>4.1. Datos epidemiológicos</b>	<b>190</b>
<b>Edad y sexo</b>	<b>190</b>



---

<b>Tabaco y alcohol</b>	<b>191</b>
<b>Estadiaje</b>	<b>191</b>
<b>Tratamientos realizados</b>	<b>192</b>
<b>Recidiva</b>	<b>194</b>
<b>Supervivencia</b>	<b>194</b>
<b>4.2. Marcaje inmunohistológico con CD31 y endogлина</b>	<b>205</b>
<b>4.3. Interpretación de resultados</b>	<b>223</b>
<b>4.4. Limitaciones del estudio</b>	<b>247</b>
 <b>CAPITULO V: DISCUSIÓN</b>	 <b>252</b>
 <b>CAPITULO VI: CONCLUSIONES</b>	 <b>272</b>
 <b>CAPITULO VII: BIBLIOGRAFÍA</b>	 <b>276</b>

“Hay médicos tan condescendientes y atentos al humor del paciente que ni siquiera insisten en la curación de la enfermedad; otros son tan estrictos cumplidores de la disciplina técnica en la enfermedad que no respetan la condición humana del paciente.”

Francis Bacon: Of Regiment of Health. En: Essays, 1597.



# **CAPITULO I**

## **I INTRODUCCIÓN**

## 1.1. CANCER ORAL Y OROFARINGEO

En la sociedad occidental actual, el cáncer es una de las principales causas de muerte, sólo superada por la enfermedad cardíaca. Mientras la investigación oncológica avanza entre logros y desafíos, la incidencia del cáncer crece cada año a pasos agigantados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que a partir del año 2002 vienen surgiendo cada año 20 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo. En los próximos 8 años, se estima que la incidencia de cáncer aumentará un 40 por ciento entre los varones y un 33 por ciento en las mujeres. En España, la mortalidad por cáncer se ha cuadruplicado entre 1950 y 1995, y entre 1995 y 2000 ha crecido un 6 por ciento. Los tumores de mayor incidencia en nuestro país son el cáncer de pulmón, seguido del cáncer colorrectal y gástrico. Con todo, y pese a que España presenta junto a Portugal y Grecia las cifras más leves de la Unión Europea, el cáncer es la segunda causa de muerte en la población española, y la primera de muerte prematura.

El cáncer de la región de Cabeza y Cuello supone aproximadamente el 5 a 7 por ciento del total de cánceres diagnosticados. El cáncer oral – refiriéndonos exclusivamente al carcinoma de células escamosas – constituye el 3 por ciento del total en el mundo occidental, siendo el tumor más prevalente del tracto aerodigestivo superior<sup>1-2</sup>. Sin embargo en el subcontinente de la India, el carcinoma epidermoide de cavidad oral llega a representar más del 40 por ciento del total de cánceres diagnosticados. Ello indica la fuerte influencia medioambiental y cultural en la prevalencia de esta enfermedad<sup>3</sup>.

En varones, la mayor incidencia de cáncer oral estandarizada por edades se registra en Francia (13.4 casos / 100.000 habitantes), y la menor en Japón (0.5 / 100.000). En mujeres, la mayor incidencia por edades se registra en India (15.7 / 100.000), y la menor en Japón (0.2 / 100.000)<sup>4-5</sup>. Tradicionalmente se ha descrito que la mayoría de pacientes con cáncer de

cavidad oral y orofaringe son varones. Sin embargo, en los últimos 50 años hemos asistido a un preocupante incremento de la incidencia en mujeres<sup>2</sup>.

En España, cada año aparecen aproximadamente 5.000 nuevos casos de cáncer de cavidad oral. El manejo terapéutico de estos pacientes oncológicos ocupa más del 50% de la actividad quirúrgica bajo anestesia general de los servicios hospitalarios de Cirugía Oral y Maxilofacial de nuestro país. El consumo de recursos, tanto humanos como materiales, también es muy elevado en la red sanitaria pública, y además presenta una tendencia al alza progresivamente más acusada.

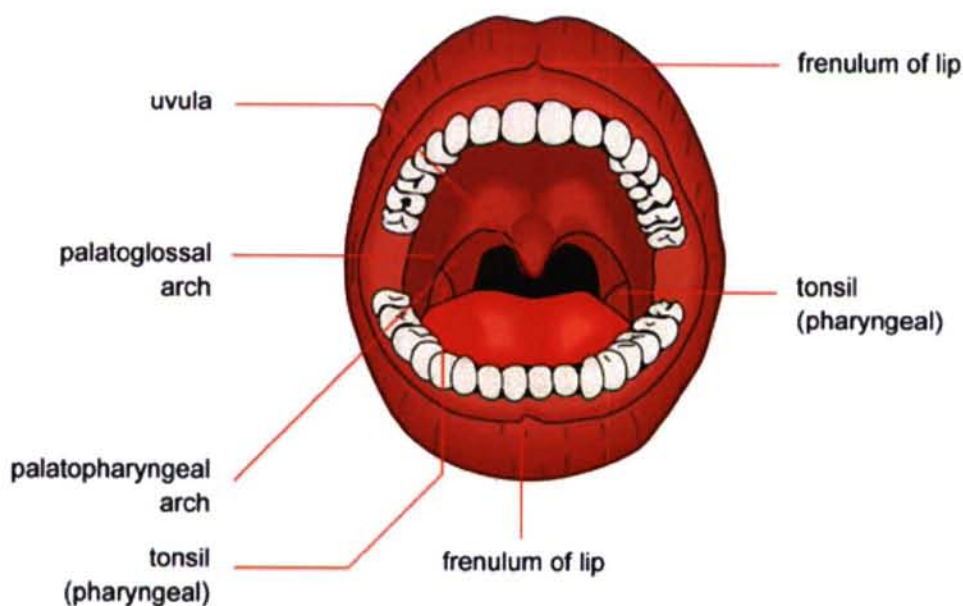
En Estados Unidos, según datos epidemiológicos recientes, el cáncer de cavidad oral es un problema de salud pública significativo, puesto que las cifras anuales que publica la National Cancer Data Base son cada vez mayores. En el año 2002, se diagnosticaron 29.000 nuevos casos en Estados Unidos, con una mortalidad de aproximadamente 25%<sup>5-6</sup>.

A pesar de los enormes avances acontecidos en el manejo terapéutico del cáncer en el pasado siglo, los datos de supervivencia de pacientes con cáncer de cabeza y cuello siguen siendo inaceptablemente bajos. Incluso con tratamiento multidisciplinario, el porcentaje de curación libre de enfermedad a los 5 años del diagnóstico no ha conseguido superar el 50 por ciento en las últimas décadas. Parece que ello es debido principalmente al diagnóstico tardío, en estadios avanzados, de un considerable número de pacientes. La supervivencia global libre de enfermedad a los 5 años de pacientes tratados por cáncer de cabeza y cuello se estima en alrededor del 70 por ciento en la enfermedad temprana y del 30 por ciento en la enfermedad avanzada, incluyendo todas las sublocalizaciones<sup>7</sup>. Más preocupante aún es el hecho de que estos datos se hayan mantenido con mínimas variaciones en las últimas décadas.



### 1.1.1. Anatomía aplicada de la cavidad oral

La cavidad oral es la porción del tracto aerodigestivo superior que comienza a nivel de los labios y se extiende hasta la superficie anterior del arco de las fauces. Se encuentra tapizada por un epitelio escamoso con múltiples glándulas salivares menores esparcidas por su interior. La cavidad oral también contiene los procesos dentoalveolares, con las arcadas dentarias superior e inferior, y diversas estructuras con tejido conjuntivo. Los tumores primarios de la cavidad oral, por lo tanto, pueden desarrollarse a partir del epitelio de revestimiento, de las glándulas salivares menores, o de los tejidos blandos submucosos. Por otra parte, también pueden asentar en la cavidad oral tumores de origen en tejidos dentarios, tumores óseos, o tumores de estirpe neurovascular.



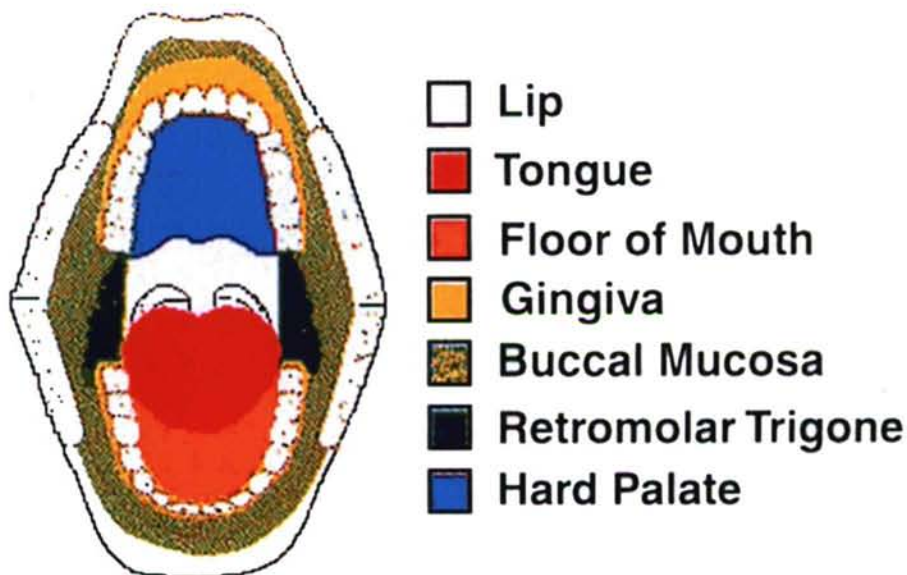
**Figura 1.** Anatomía de cavidad oral y orofaringe.

La cavidad oral, a efectos de estudios epidemiológicos, se consideró dividida en siete localizaciones anatómicas por el American Joint Committee for Cancer Staging:

- Labios.

- Mucosa bucal.
- Trígono retromolar.
- Lengua móvil (dos tercios anteriores de la lengua).
- Suelo de boca.
- Encía.
- Paladar duro.

La clasificación de los tumores por su localización es muy importante porque presentan patrones específicos de invasión y diferentes consecuencias clínicas en cada una de las regiones descritas.



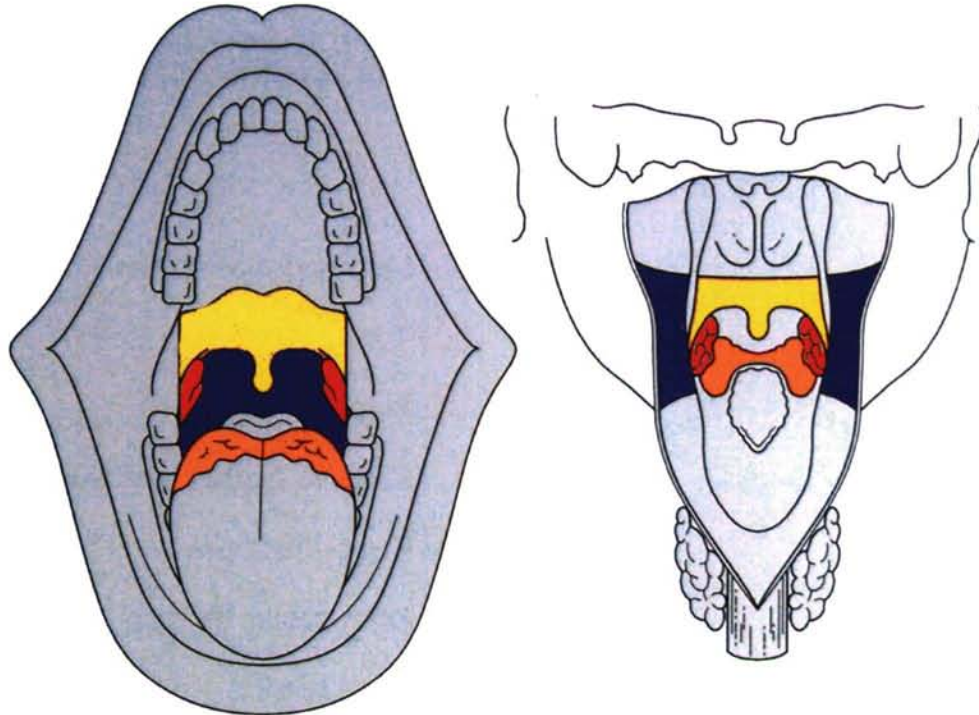
**Figura 2.** Localizaciones anatómicas de tumores de cavidad oral.

La región de la orofaringe se extiende posteriormente a partir de los pilares anteriores del istmo de las fauces. Incluye las fosas amigdalares de cada lado, así como las paredes laterales y posteriores de la faringe y la base de la lengua.

La región orofaríngea permite diferenciar otra serie de regiones anatómicas:

- Paladar blando.
- Región amigdalina.

- Base de lengua (tercio posterior de la lengua).
- Pared lateral faríngea.
- Pared posterior faríngea.



Soft palate
  Base of tongue
  Tonsil
  Pharyngeal wall

**Figura 3.** Localizaciones anatómicas de tumores de orofaringe.

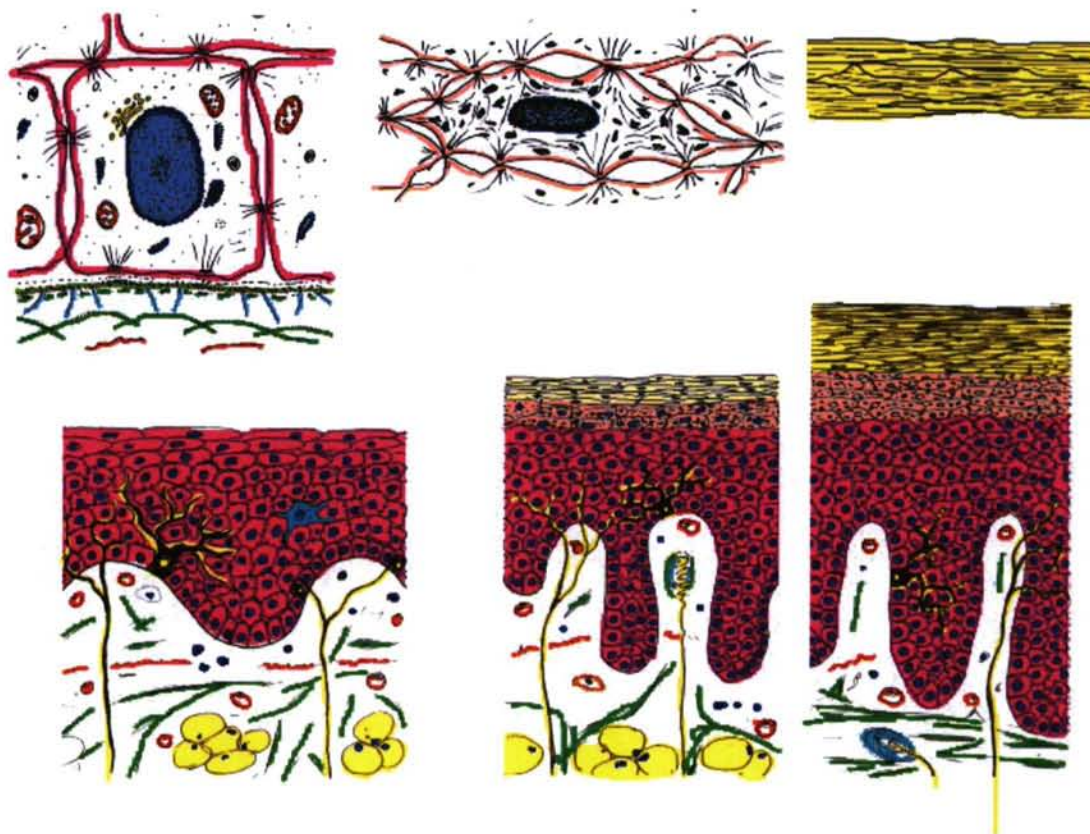
Aunque los tumores de estirpe epitelial son los más frecuentemente encontrados en la orofaringe, también es frecuente el desarrollo de linfomas, debido a la abundancia de tejido linfóide a este nivel, un componente significativo del anillo de Waldeyer.

La cavidad oral se encuentra tapizada por una mucosa, que funcionalmente puede comportarse como:

- estructura tapizante, por ejemplo en suelo de boca;
- estructura funcional, por ejemplo en paladar;
- estructura especializada, por ejemplo en dorso de lengua.



Histológicamente la membrana mucosa de la cavidad oral está compuesta de un epitelio escamoso estratificado que, a diferencia de la piel, es normalmente no queratinizado, no contiene estrato lucidum, y tiene un rico aporte vascular y una gran inervación. Ello determina que la mucosa oral sea relativamente más sensible que la piel y presente un mayor potencial de cicatrización.



**Figura 4.** Esquemas ilustrativos de la histología de la mucosa oral en diferentes localizaciones, con distintos grados de queratinización.

Sin embargo, la mucosa oral es más susceptible que la piel a agentes carcinogénicos ambientales, debido a su gran permeabilidad. La saliva juega un papel protector muy significativo, pero no suficiente para evitar la acción de tantos factores perniciosos.

### 1.1.2. Función de la cavidad oral

La cavidad oral ejecuta funciones primordiales en la vida de relación:



- Masticación y deglución.
- Fonación.
- Expresión facial y emocional.

El cáncer de cavidad oral comprometerá la práctica de funciones tan relevantes para la vida del hombre. Consecuentemente, nuestro tratamiento debe ir encaminado a restaurar, en la medida de lo posible, las funciones perdidas. En la realidad, sin embargo, el tratamiento actual del cáncer es muy agresivo y mutilante, es decir, tiende a exacerbar aún más el compromiso funcional. Por lo tanto la reconstrucción y la rehabilitación juegan un papel tan importante en el manejo completo del cáncer como la curación del paciente oncológico. Hoy en día, un paciente que consiga remisión completa de su cáncer pero que sea incapaz de alimentarse, hablar o parecer una persona normal, tiene muy reducida su calidad de vida, y no puede ser considerado como un éxito terapéutico.

### **1.1.3. Epidemiología del cáncer de cavidad oral**

La epidemiología es la base a partir de la cual las estrategias preventivas de la enfermedad son formuladas.

#### **Epidemiología descriptiva**

La epidemiología descriptiva examina los patrones de ocurrencia de la enfermedad en la población. Por lo tanto, estudia la extensión y significancia del problema del cáncer de cavidad oral en términos de: número de casos, tendencias en el tiempo, distribución geográfica, porcentajes de incidencia o mortalidad en diferentes grupos de población.

Si la tendencia en la incidencia de estos tumores continúa aumentando, se estima que se diagnosticarán en el mundo más de 400.000 casos nuevos de cáncer oral en el año 2007. España, con una incidencia anual ajustada a la población europea de 31.4 casos nuevos por 100.000 habitantes, es, después de Francia, el segundo país europeo con una tasa de incidencia más elevada.

## **Epidemiología analítica**

La epidemiología analítica examina las relaciones etiológicas del cáncer oral, con especial énfasis sobre: causas de cáncer oral, factores determinantes de progresión de la enfermedad.

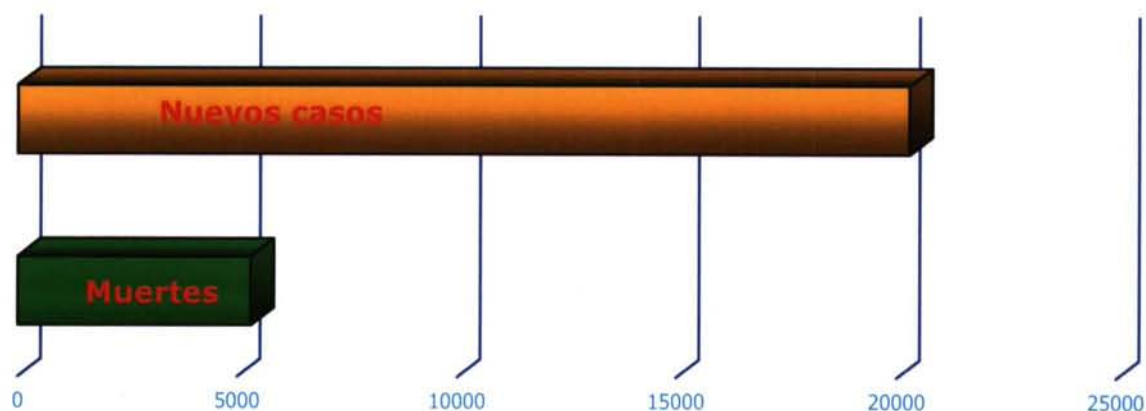
Un gran número de estudios epidemiológicos han identificado de forma consistente el consumo de tabaco y alcohol como los dos principales factores etiológicos para éste cáncer. Se estima que estos dos hábitos combinados explican aproximadamente un 90 por ciento de la incidencia de cáncer oral. Otros factores de riesgo asociados al cáncer oral son dietas pobres en frutas y verduras, deficiencias de micronutrientes, historia familiar de cáncer y una pobre higiene oral. Algunos virus, en especial el virus del papiloma humano (VPH), y determinadas modificaciones genéticas, también han sido relacionados directa o indirectamente con el desarrollo de tumores de la cavidad oral.

## **Ocurrencia de la enfermedad en una población activa**

La incidencia se refiere al número de casos nuevos, mientras que la prevalencia determina el número de casos existentes.

En los Estados Unidos de Norteamérica, el cáncer de cavidad oral es más prevalente entre pacientes mayores que en jóvenes<sup>4-5</sup>. En 1995, la American Cancer Society registró 19.000 nuevos pacientes diagnosticados de cáncer oral en la población de Estados Unidos, y 4.200 muertes ese año por esta enfermedad.

La American Cancer Society estimó que 20.300 nuevos casos de cáncer de cavidad oral fueron diagnosticados en el año 2000. Para ese mismo año se estimó que 5.300 personas fallecieron en Estados Unidos de cáncer oral.



**Figura 5.** Datos de la American Cancer Society correspondientes a la población de Estados Unidos en el año 1995.

En el Reino Unido la incidencia de cáncer oral se cifra en dos nuevos pacientes por cada 10.000 habitantes cada año. Evidencias recientes sugieren que estas cifras se encuentran en una tendencia ascendente, y lo que es más preocupante, se están incrementando en personas jóvenes por debajo de 40 años<sup>8-12</sup>.

De acuerdo a la base de datos del *National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results*, el cáncer de cavidad oral se considera el undécimo más común entre hombres y mujeres. Los varones desarrollan la enfermedad más frecuentemente que las mujeres, aunque la relación varones:hembras está reduciéndose en los últimos años. Hace años se consideraba que este cáncer afectaba a los hombres con una frecuencia 3 veces mayor que a las mujeres<sup>13</sup>. En la década de los 90, esta ratio se consideró cifrada en 2:1<sup>3,14</sup>. Las publicaciones más recientes registran una preocupante tendencia decreciente de esta ratio, con un incremento significativo de las cifras de incidencia y prevalencia de cáncer de cavidad oral entre el sexo femenino<sup>2,15</sup>. De todas formas, este cáncer sigue matando en proporción significativamente mayor a varones que a hembras<sup>5</sup>.



En el momento actual se estima que en el mundo aparecen 270.000 nuevos casos al año en varones y 143.000 en mujeres. Ello determinaría una ratio varones:hembras de 1.88. La creciente incidencia de los últimos años ha situado al cáncer de cabeza y cuello como el quinto más frecuente en varones y el séptimo en mujeres<sup>5</sup>.

Desde el punto de vista racial, se ha publicado una mayor mortalidad en la raza negra<sup>13,16-18</sup>. Sin embargo, estas diferencias raciales deben ser interpretadas con precaución, dado que se ven claramente condicionados por factores asociados como factores medioambientales y de estilo de vida<sup>5</sup>.

#### **1.1.4. Etiología del cáncer oral**

Los factores de riesgo más frecuentemente asociados con el desarrollo del carcinoma epidermoide oral en nuestro medio son el abuso de tabaco y alcohol, la mala higiene oral, la edad avanzada, y el género masculino.

Los aspectos etiológicos serán analizados de forma pormenorizada en capítulos posteriores de este trabajo.

#### **1.1.5. Estrategias preventivas**

La prevención desempeña un papel esencial en el control y disminución de la incidencia del cáncer oral en el seno de la sociedad. Se describen estrategias preventivas a tres niveles:

##### **1. *Prevención primaria.***

Tiene por objeto la reducción o eliminación completa de la exposición a agentes con potencial carcinógeno. De esta manera se previene la iniciación o promoción del proceso carcinogénico básico. Ejemplos serían dejar de fumar o reducir el consumo de alcohol.

##### **2. *Prevención secundaria.***



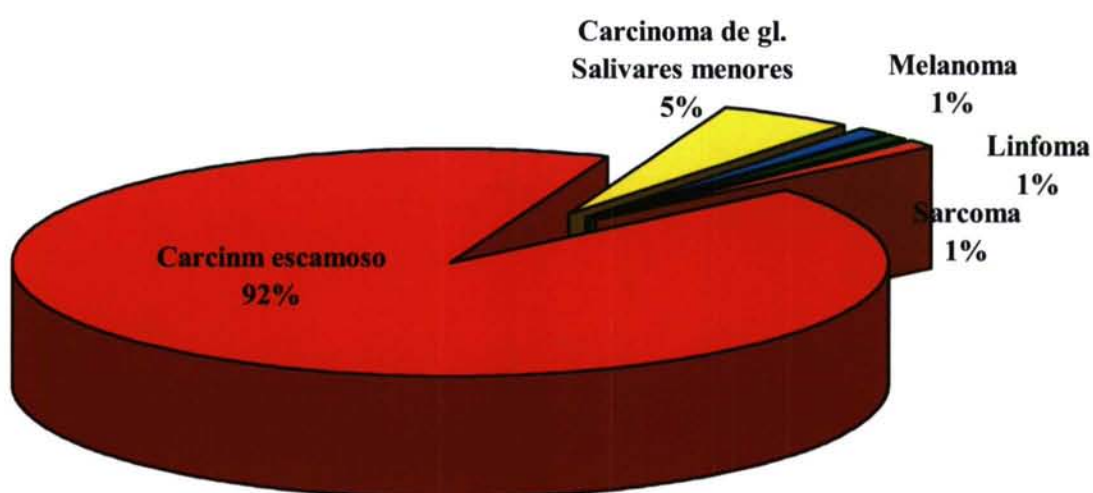
Se refiere al establecimiento de un sistema de screening o cribaje, y al desarrollo de programas de detección precoz, que permitan identificar los casos en estadíos iniciales, con lo que se incrementaría el porcentaje de curación y de supervivencia.

### 3. *Prevención terciaria.*

Consiste en el tratamiento adecuado del cáncer oral, dirigido a la curación de la enfermedad sin complicaciones indebidas.

## 1.1.6. Histopatología del cáncer oral

Aunque los diferentes tejidos de la cavidad oral pueden ser asiento de una gran variedad de estirpes histológicas tumorales, más del 90 por ciento de estos tumores son carcinomas de células escamosas. Las neoplasias de glándulas salivares menores son las siguientes en frecuencia. Otros tumores como melanoma de mucosa oral, sarcoma de partes blandas o maxilares, o linfomas, se localizan raramente en la cavidad oral. En el caso de los linfomas, existe una creciente frecuencia de aparición de los mismos en nuestras consultas.



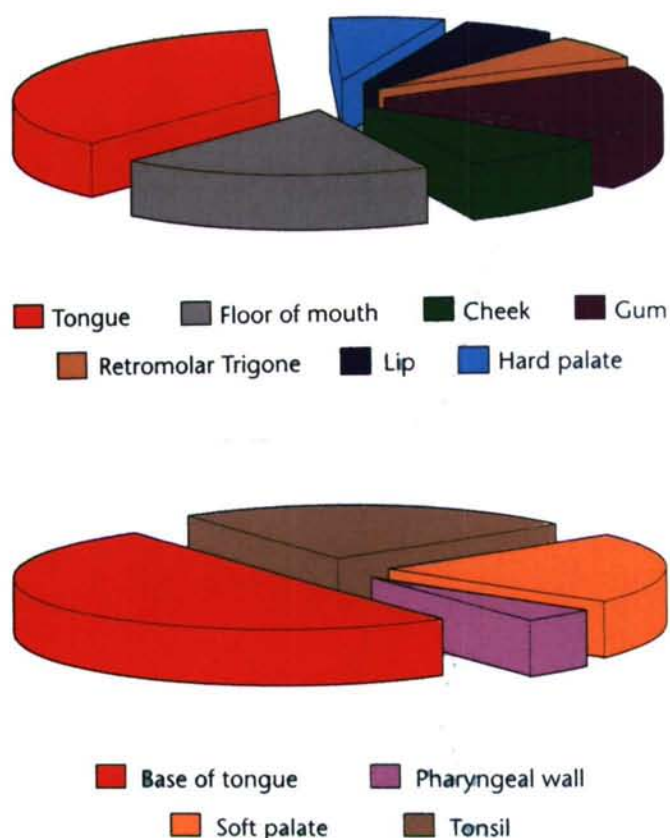
**Figura 6.** Frecuencia de variantes histológicas de tumores de cavidad oral y orofaringe.

### **1.1.7. Localización del cáncer de cavidad oral y orofaringe**

Previamente se ha mencionado la importancia de la clasificación de las lesiones malignas de cavidad oral en función de su localización. La distribución aproximada de lesiones cancerosas en la cavidad oral es la siguiente<sup>3</sup>:

- Labio inferior	30%.
- Lengua	20%.
- Suelo de boca	15%.
- Encía y región alveolar	15%.
- Mucosa bucal	10%.
- Paladar	10%.

La serie del Servicio de Cirugía de Cabeza y Cuello del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nueva York es muy similar. En la figura 7 se muestra la distribución de tumores de cavidad oral y orofaringe en su medio<sup>2</sup>.



**Figura 7.** Distribución por localizaciones de tumores primarios de cavidad oral y orofaringe. Serie del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nueva York.

Moore y Catlin, en 1967<sup>19</sup>, establecieron que el 75 por ciento de los carcinomas escamosos de cavidad oral se localizan en un área anatómica que representa menos del 20 por ciento de la superficie de la mucosa oral. Esta área incluye la superficie lingual de la región alveolar mandibular, el suelo de la boca y la cara ventral de la lengua móvil. Estos autores las denominaron como las "sump areas".

### **1.1.8. Evaluación del paciente de cáncer oral y orofaríngeo**

Los cuidados del paciente se inician mediante una exhaustiva evaluación de su problema, de modo que se pueda proponer la planificación terapéutica más apropiada. El tratamiento del paciente con cáncer establece un compromiso vital prolongado puesto que no termina con la finalización del tratamiento sino que continúa indefinidamente. El seguimiento a largo plazo de estos pacientes es una parte integral del manejo global del enfermo oncológico.

#### **Evaluación preoperatoria**

El primer encuentro con un paciente de cáncer oral debe iniciarse con un interrogatorio clínico, seguido de la exploración del problema apoyada en los medios diagnósticos disponibles, antes de proceder a la toma de cualquier decisión terapéutica.

La evaluación preoperatoria del paciente oncológico se basa en tres elementos fundamentales: historia clínica, exploración física, e investigaciones complementarias.

##### **1. Historia clínica.**

La entrevista verbal con el paciente neoplásico es esencialmente el primer paso hacia el establecimiento de una consideración general de la enfermedad. La historia clínica se lleva a cabo de manera ordenada, incidiendo en aspectos especiales en este tipo de pacientes:

- Sintomatología o semiología con que debuta la enfermedad ("chief complaint"). Por ejemplo, úlcera dolorosa en suelo de boca.
- Evolución temporal de dicha sintomatología. Por ejemplo, lesión ulcerativa que ha empeorado progresivamente en los 3 últimos meses.



- Historial médico. Por ejemplo, alergias, medicación, enfermedades sistémicas, hospitalizaciones e intervenciones previas.
- Historia social. Por ejemplo, hábito tabáquico, alcoholóloco, si vive solo, etc.
- Valoración sistémica. Por ejemplo, pérdida de peso, dificultades a la deglución, tos crónica, anorexia.

## 2. Exploración física.

Consiste básicamente en una inspección sistémica y palpación de los tejidos. La palpación de la tumoración es fundamental para obtener información del tamaño, límites anatómicos e infiltración de estructuras adyacentes.

- Exploración de cabeza y cuello
  - Inspección:
    - Apariencia general: caquexia, debilidad, ictericia, depresión.
    - Características faciales: asimetrías, tumefacción, coloración cutánea.
    - Trismus: limitación de la apertura oral.
  - Palpación:
    - Comprobar adenopatías cervicales y otras masas.
    - Tumefacción: comprobar fluctuación, induración, dolor, adherencia a estructuras vecinas, etc.
- Exploración intraoral
 

Se precisa iluminación adecuada, espejo dental y separador labial.

  - Inspección:
    - Comprobar la presencia de lesiones mucosas blancas, o enrojecidas, ulceraciones, lesiones exofíticas, cambios focales en la mucosa, etc.
    - Textura y motilidad de la lengua.

- Trastornos de la superficie mucosa.
- Dientes: movilidad dentaria, estado de salud dental y periodontal, oclusión, etc.
- Palpación:
  - Firmeza e induración de cualquier masa presente.
  - Grado de induración de cualquier lesión ulcerativa.
  - Fundamental la palpación exhaustiva de la tumoración, con especial énfasis en determinar los límites de la misma, y su movilidad o fijación a tejidos adyacentes. En la cavidad oral resulta complicado la palpación de los límites posteriores, que obliga en ocasiones a molestar al paciente con un tacto digital de zonas anatómicas comprometidas.

Desde luego resulta imprescindible realizar una exploración concienzuda de todas las estructuras de la cavidad oral.

### 3. Exploraciones complementarias.

Las exploraciones complementarias proporcionan importante información adicional que no puede ser obtenida a través de la historia clínica ni de la exploración física básica.

- Radiología
  - Ortopantomografía: La radiografía panorámica de los maxilares es una exploración básica que permite establecer la afectación de los dientes y los huesos maxilares por la lesión maligna.
  - Radiografías de Waters, Caldwell, laterales faciales, desenfiladas de ATM, Hirtz. Ocasionalmente son necesarias para la valoración de regiones específicas.

- TAC: Es una herramienta excelente, que constituye en la actualidad la principal fuente de referencia para la planificación terapéutica.
  - Resonancia Magnética: Proporciona excelente información sobre los tejidos blandos, y cada vez se constituye como un elemento más imprescindible a medida que se va obteniendo mayor experiencia en su manejo e interpretación.
  - Fibroscopia: Permite la visualización de las vías aerodigestivas superiores con escasas molestias al paciente. Resulta fundamental para la delimitación posterior de tumores de localización en las regiones más posteriores de la cavidad oral y orofaringe.
  - Radiografía de tórax: Tienen valor para el despistaje de posibles metástasis pulmonares, la valoración de la función respiratoria del paciente, y para el estudio preoperatorio que requiere el anestesista.
  - Exploraciones de Medicina Nuclear: Se refiere a estudios gammagráficos que tienen gran valor en el estudio de extensión de la enfermedad a otros sistemas.
  - PET (Tomografía por emisión de positrones): Exploración de gran auge en la actualidad, puesto que aporta mucha información en el diagnóstico diferencial de lesiones oncológicas con lesiones de otra estirpe.
  - Otras exploraciones pueden ser precisas para el estudio de extensión de la tumoración: Ecografía abdominal, TAC torácico o abdominal, etc.
- Biopsia



## Características clínicas y diagnóstico

Las características clínicas de los tumores primarios derivados de la cavidad oral y orofaringe son muy variables. Pueden ser lesiones ulcerativas, exofíticas o endofíticas, o bien lesiones superficiales proliferativas. Las características clínicas de estos tumores suelen ser suficientes para despertar un alto grado de sospecha diagnóstica e indicar la toma de una biopsia para confirmar histológicamente el diagnóstico de presunción.

Las lesiones ulcerativas se acompañan normalmente de un margen sobreelevado e induración de los tejidos vecinos. Por su parte, las lesiones exofíticas pueden tomar el aspecto de una "coliflor" de crecimiento irregular, o pueden ser más aplanadas, de tono rosado, o grisáceo, con un fondo blanquecino. En ocasiones se presenta como una lesión enrojecida de aspecto aterciopelado.



**Figura 8.** Diferentes aspectos de lesiones primarias de cáncer de lengua.

Los carcinomas escamosos con gran componente queratínico, al igual que ocurre con los carcinomas verrucosos, se presentan con frecuencia como lesiones blanquecinas sobreelevadas con grados variables de residuos queratósicos en superficie. La presencia de una proyección papilar es más característica de un papiloma escamoso.

La presencia de áreas hemorrágicas en superficie es bastante típica de lesiones malignas y debe despertar inmediatamente nuestra sospecha diagnóstica de un proceso neoplásico.

## Biopsia

El diagnóstico de una lesión maligna debe ser confirmado histológicamente. Para ello se debe realizar una punción-aspiración con aguja (PAAF) o mejor, si es posible, una excisión en cuña del tejido para su estudio



anatomopatológico. Se debe tomar la muestra del tejido de la periferia de la lesión, incluyendo tejido macroscópicamente sano. Algunos autores proponen la toma de tejido del centro de la lesión, obteniendo abundante cantidad de tejido viable en profundidad.

En los carcinomas escamosos muy queratósicos y los carcinomas verrucosos con frecuencia no se obtiene tejido representativo de la superficie de la lesión, por lo que una biopsia superficial puede producir un resultado falsamente negativo. En estos casos es fundamental tomar tejido suficiente de la periferia, o mejor de la zona profunda de la lesión.

Si la biopsia no nos es informada de lesión carcinomatosa y tenemos un alto índice de sospecha diagnóstica, se debe repetir la biopsia hasta tener una certeza diagnóstica de la lesión.

### **Retrasos en el diagnóstico**

En Oncología de Cabeza y Cuello, al igual que ocurre a otros niveles de la economía orgánica, el *diagnóstico precoz* es la clave para mejorar los resultados terapéuticos. Un diagnóstico tardío ensombrece enormemente el pronóstico a largo plazo, independientemente de que el tratamiento aplicado sea correcto.

Los factores que pueden determinar que un diagnóstico de cáncer se retrase pueden estar asociados al propio paciente o al médico u odontólogo que ve al paciente por primera vez:

- Factores asociados al propio paciente:
  - Temor.
  - Ignorancia.
  - Aislamiento geográfico.
  - Elevado nivel de tolerancia: los síntomas iniciales no generan preocupación al paciente.
- Factores asociados al médico / odontólogo:
  - Historia clínica o exploración insuficientes.
  - Bajo índice de sospecha diagnóstica.

- Ignorancia de los síntomas o signos característicos de una enfermedad maligna.

Probablemente la mejor estrategia para mejorar la supervivencia de esta enfermedad sea establecer medidas preventivas de educación de la población mediante programas de salud pública o campañas informativas sobre el cáncer oral y su diagnóstico inicial.

### **1.1.9. Estadiaje tumoral**

La clasificación por estadíos de las lesiones primarias neoplásicas de cavidad oral y orofaringe fue acordada por el American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Union Internationale Contre le Cancer (UICC) en 1988, y ha sido universalmente aceptada<sup>20</sup>.

El propósito inicial de estadiar la enfermedad tumoral consiste en establecer una descripción del tumor que sea estandarizada y comunicable. Esto ayuda a una mejor planificación terapéutica y a un mejor establecimiento del pronóstico de la enfermedad. Además, permite una comparación de resultados obtenidos en diferentes centros y con diferentes estrategias terapéuticas. Esta clasificación TNM se aplica a las lesiones primarias de cualquier localización tumoral de cavidad oral y orofaringe.

#### **Clasificación TNM**

T = Tumor primario.

T0 = No evidencia de tumor primario.

Tis = Carcinoma in situ.

T1 = Lesión de diámetro mayor  $\leq 2$  cm.

T2 = Lesión de diámetro mayor  $> 2$  cm pero  $\leq 4$  cm.

T3 = Lesión de diámetro mayor  $> 4$  cm.

T4 = Tumor masivo que infiltra estructuras vecinas (óseas, musculares, ...).

N = Metástasis en ganglios linfáticos cervicales.

N0 = No evidencia de adenopatías cervicales.

N1 = Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral  $\leq 3$  cm.

N2a = Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral  $> 3$  cm pero  $\leq 6$  cm.

N2b = Metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales  $\leq 6$  cm.

N2c = Metástasis en ganglios linfáticos contralaterales o bilaterales, ninguno  $> 6$  cm.

N3 = Metástasis en ganglios linfáticos  $> 6$  cm.

M = Metástasis a distancia.

M0 = No evidencia de metástasis a distancia.

M1 = Presencia de metástasis a distancia.

### **Estadíos del cáncer oral y de orofaringe**

Estadío 0 = Tis N0 M0.

Estadío I = T1 N0 M0.

Estadío II = T2 N0 M0.

Estadío III = T3 N0 M0, o T1,2,3 N1 M0.

Estadío IV = T4 N0,1 M0, o cualquier T N2,3 M0, o cualquier T cualquier N M1.

Una deficiencia descrita para esta clasificación TNM es la omisión de la profundidad de infiltración del tumor. Lesiones en estadíos precoces pero muy infiltrantes en profundidad tienen un elevado riesgo de desarrollar metástasis regionales y a distancia, y mucho mayor riesgo de muerte por la enfermedad que tumores similares superficiales. Por tanto, deben ser susceptibles de un tratamiento más agresivo. Por el contrario, lesiones en estadío avanzado pero más superficiales tienen un pronóstico mejor<sup>21,22</sup>.

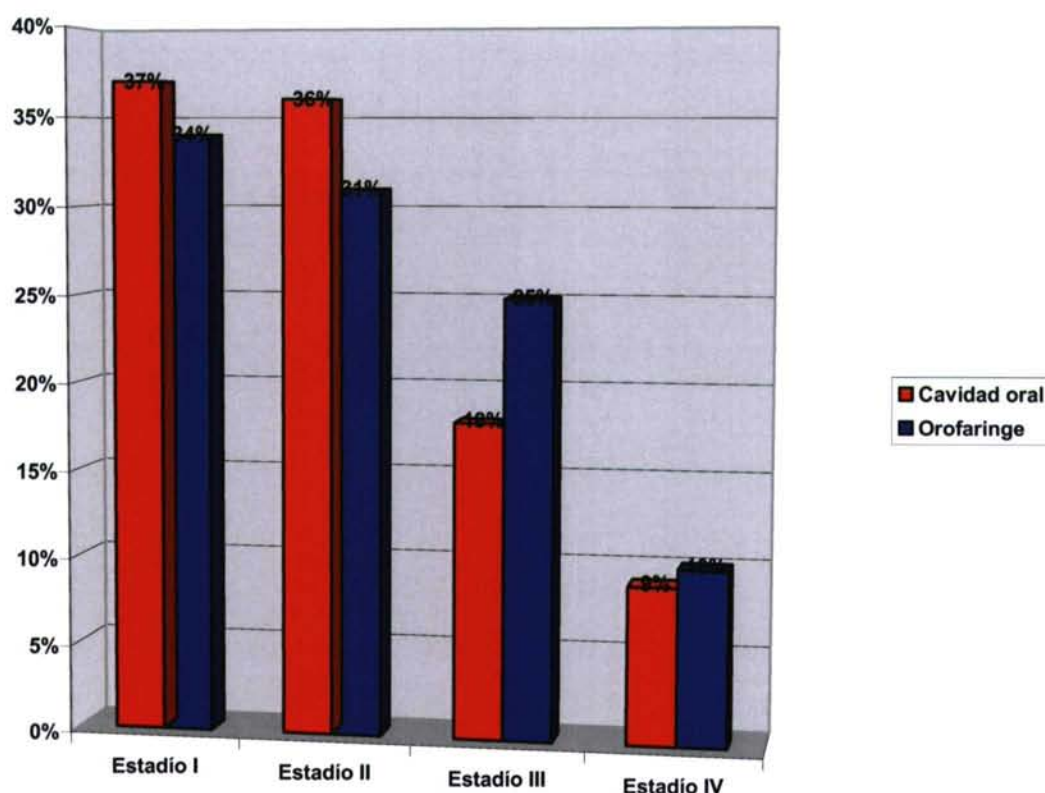
Spiro et al<sup>23</sup> encontraron que los pacientes con tumores de 2 mm o menos de grosor tenían muchoa menor probabilidad de desarrollar enfermedad metastásica y muerte relacionada con el tumor que los pacientes con tumores



más profundos de 2 mm. Mohit-Tabatabai et al<sup>24</sup> encontraron un incremento significativo de recidivas en pacientes con tumores de grosor superior a 1,5mm. En el registro tumoral Dösak de Alemania se objetivó que tumores de espesor igual o inferior a 4 mm tenían una probabilidad de metástasis de tan solo un 10%, y en tumores de 2 mm de espesor o menos esta probabilidad descendía a un 3%<sup>25</sup>.

### **Distribución por estadíos del carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe**

En la última década, un excesivo porcentaje de casos de cáncer de cavidad oral y orofaringe se diagnosticaban en estadíos avanzados, lo que ensombrecía seriamente su pronóstico. Afortunadamente en los últimos años, probablemente asociado a la mayor información y educación sanitaria de la población, hemos asistido a la reversión de esa preocupante tendencia. En la figura 9 se ilustra la distribución por estadíos del carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nueva York.



**Figura 9.** Distribución por estadios de carcinoma epidermoide de cavidad oral y orofaringe. Serie del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nueva York.

### 1.1.10. Factores que afectan al tratamiento. Objetivos terapéuticos.

Los factores que inciden en la decisión terapéutica son aquellos relacionados con las características del tumor primario, aquellos relacionados con el paciente, y aquellos relacionados con el equipo de tratamiento. A la hora de seleccionar el tratamiento más adecuado, se deben considerar en su justa medida los tres tipos de factores mencionados.

#### 1. Factores relacionados con el tumor:

- Localización de la lesión primaria tumoral.

- Tamaño tumoral (estadiaje T).
- Invasión de estructuras vecinas.
- Proximidad a hueso maxilar y/o mandibular.
- Estado de los ganglios linfáticos cervicales.
- Tratamientos realizados previamente.
- Histología de la tumoración: tipo histológico, grado de diferenciación y profundidad de invasión.

## 2. Factores relacionados con el paciente:

- Edad.
- Estado general del paciente.
- Capacidad de tolerancia al tratamiento.
- Ocupación.
- Aceptación del tratamiento y consentimiento para su realización.
- Estilo de vida: hábitos tóxicos (tabaco, alcohol), higiene, aislamiento social.
- Consideraciones socio-económicas.
- Motivación.

## 3. Factores relacionados con el equipo médico:

El manejo terapéutico del cáncer de cabeza y cuello es un esfuerzo multidisciplinario de numerosos profesionales, que vendrá determinado al menos parcialmente por las capacidades técnicas de cada uno de ellos y los recursos existentes a su disposición. Los servicios de apoyo desde diversas perspectivas al paciente y sus familiares son asimismo esenciales para obtener resultados satisfactorios. Para alcanzar los objetivos terapéuticos en el cáncer de cabeza y cuello se precisa disponer de una organización integral de especialistas en diversas materias, entre las que cabe destacar:

- Capacidad quirúrgica, tanto exerética como reconstructiva.
- Radioterapia.
- Quimioterapia.



- Servicios de Rehabilitación.
- Tratamiento dental.
- Prótesis.
- Servicios de soporte para el paciente y sus familiares.

### **Objetivos terapéuticos**

Los objetivos últimos que se deben perseguir en el tratamiento de un paciente con cáncer de cavidad oral son:

1. Curación del cáncer.
2. Preservación o restauración de la forma y la función<sup>26</sup>.
3. Minimizar las secuelas del tratamiento.
4. Prevención de segundos tumores primarios.

Para conseguir estos objetivos, las modalidades terapéuticas disponibles son:

- Cirugía.
- Radioterapia.
- Quimioterapia.
- Terapias combinadas.
- Estrategias de prevención primaria y secundaria con modificaciones en el estilo de vida y quimioprevención.

En Oncología de Cabeza y Cuello se considera que sólo la cirugía y la radioterapia son tratamiento curativos.

En los últimos años estamos asistiendo al advenimiento de novedosas y prometedoras modalidades terapéuticas como:

- Inmunoterapia.
- Fototerapia.
- Terapia génica.
- Cirugía térmica.

### 1.1.11. Planificación terapéutica

Los dos principales objetivos terapéuticos en Oncología de Cabeza y Cuello son conseguir un estado del paciente libre de enfermedad y una calidad de vida aceptable después del tratamiento.

El tratamiento del cáncer oral generalmente lleva implícito un abordaje multidisciplinario que compromete a un equipo de varios especialistas, cada uno de los cuales tiene un papel fundamental en el cuidado global del paciente. El tratamiento en equipo del cáncer tiene un soporte sustancial en el potencial para mejorar los resultados, mediante el aprovechamiento de los recursos aportados por varias disciplinas implicadas.

En el apartado anterior se han comentado las modalidades terapéuticas disponibles en la actualidad. La decisión sobre la modalidad o modalidades a utilizar se apoya en los objetivos que nos planteamos con cada caso concreto (por ejemplo, si es un tratamiento curativo o paliativo), en el estadio de la enfermedad, el estado general del paciente y sus consideraciones sociolaborales, y en los requerimientos funcionales y estéticos de cada caso. De ello se desprende la importancia de individualizar los casos, y de estudiar multidisciplinariamente cada paciente oncológico con sus particularidades<sup>27</sup>.

El primer objetivo de cualquier tratamiento oncológico es eliminar el hábito del tabaco y alcohol por el paciente. Ningún tratamiento de cáncer de cabeza y cuello se puede esperar como exitoso a largo plazo si este cambio de hábitos del paciente no se consigue. Si el paciente continúa fumando o bebiendo, existe un riesgo del 30 al 50 por ciento de posibilidades de desarrollar una recidiva locoregional, y un riesgo de 10 a 40 por ciento de desarrollar un segundo tumor primario<sup>27,28</sup>. Además, antes de iniciar el tratamiento es imprescindible mejorar el estado general, nutricional y psicosocial del paciente. Ello no solo maximiza el beneficio terapéutico sino que también limita las complicaciones<sup>29-30</sup>.

Tanto la cirugía como la radioterapia pueden ser utilizadas de forma única o combinada en el tratamiento del cáncer de cavidad oral y orofaringe



con fines curativos. En el momento actual el papel de la quimioterapia permanece en fase de estudios de investigación, sin haber demostrado resultados más que en planteamientos paliativos<sup>7,31</sup>.

Los tumores pequeños y superficiales de la cavidad oral presentan resultados curativos similares con resección quirúrgica y con braquiterapia<sup>32</sup>. Por lo tanto, en estadíos precoces (I y II), con tumores correspondientes a T1 o T2, el tratamiento con cirugía o con braquiterapia es de elección. Con ello se obtienen índices curativos de 80 a 100 por ciento, con una morbilidad mínima<sup>27,33,34</sup>. La selección de un tratamiento u otro dependerá de otros factores asociados como la localización del tumor, la experiencia del equipo quirúrgico, o la preferencia del paciente. Se deben valorar complicaciones potenciales, costes, conveniencia, o posibles secuelas<sup>35</sup>. Las ventajas de la cirugía incluyen la capacidad para eliminar totalmente el tumor en poco tiempo. Además, permite reservar la radioterapia para una posible recidiva o un segundo primario que el paciente desarrolle a lo largo de su vida. Por su parte, la radioterapia aporta la ventaja de la conservación del órgano y la función.

Los tumores avanzados, estadíos III y IV, presentan mayores problemas a la hora de planificar el manejo terapéutico. En la actualidad, cualquier estrategia curativa pasa por la cirugía. Sin embargo este tipo de tumores avanzados generalmente tienen un comportamiento biológico muy agresivo e infiltran muchas estructuras vecinas. Ello obliga a resecar grandes áreas tisulares. A pesar de los grandes esfuerzos del cirujano, que le obligan a la ejecución de estas grandes mutilaciones, con frecuencia las células tumorales ya no están limitadas a la masa tumoral. El control de la microenfermedad tumoral obliga a una terapia combinada de cirugía con radioterapia.

La radioterapia preoperatoria obligaría a retrasar la cirugía. Ese tiempo podría ser aprovechado para mejorar las condiciones nutricionales y el estado general del paciente<sup>36</sup>. Clásicamente se considera que la radioterapia preoperatoria incrementa la "resecabilidad" quirúrgica de la masa tumoral. Sin embargo, los límites de resección deben ser los mismos que los previos al tratamiento radioterápico. Ello es debido al conocimiento de que la respuesta



tumoral no se realiza de forma concéntrica sino multicéntrica. Por lo tanto, después de la radioterapia permanecerían islotes tumorales adyacentes al tumor residual. De esta forma, los márgenes de la resección quirúrgica deberán ser esencialmente los mismos que los precisos en ausencia de radioterapia preoperatoria. En pacientes que precisan reconstrucción, esta modalidad de radioterapia preoperatoria ofrece la ventaja de que no altera la cirugía reconstructiva. Sin embargo, hoy en día se considera que la reconstrucción primaria en la misma cirugía es el mejor tratamiento, por lo que la radioterapia preoperatoria no se considera ventajosa en este aspecto. Además, los tejidos irradiados tienen un menoscabo considerable de su capacidad cicatricial y de curación, y conllevan un alto riesgo de complicaciones en las heridas quirúrgicas, que además es dosis-dependiente. Por tanto, otra desventaja de la radioterapia preoperatoria sería la limitación de dosis.

En la actualidad, la inmensa mayoría de los equipos de tratamiento prefieren estrategias de terapias combinadas en estadios III y IV consistentes en resección quirúrgica de los tumores, con reconstrucción inmediata en los casos precisos, y radioterapia complementaria postoperatoria<sup>37</sup>. Estas estrategias ofrecen resultados comparables, o incluso superiores en el control local y regional de la enfermedad. Con ello, no se retrasa la resección quirúrgica ni existen problemas de limitación de dosis radiactiva, y se pueden administrar en torno a 60 Grays en el lecho quirúrgico del tumor primario y a nivel cervical, e incluso boost de sobredosis en áreas de riesgo elevado de recidiva. Además, la radioterapia postoperatoria no compromete la herida quirúrgica ni el proceso de cicatrización, con lo que se minimizan las complicaciones del postoperatorio<sup>38</sup>.

El tratamiento quirúrgico del cáncer de cabeza y cuello ha experimentado un avance considerable en la década de los 80 y 90, asociado a la implantación masiva de técnicas de reconstrucción basadas en la microcirugía. Ello ha permitido un amplio abanico de opciones reconstructivas, con tejido altamente vascularizado, resistente a noxas externas, y mejor adaptable a los defectos

oncológicos. La consecuencia más importante ha sido la mejora substancial en la calidad de vida de los pacientes oncológicos<sup>39,40</sup>.

### **1.1.12. Seguimiento postratamiento**

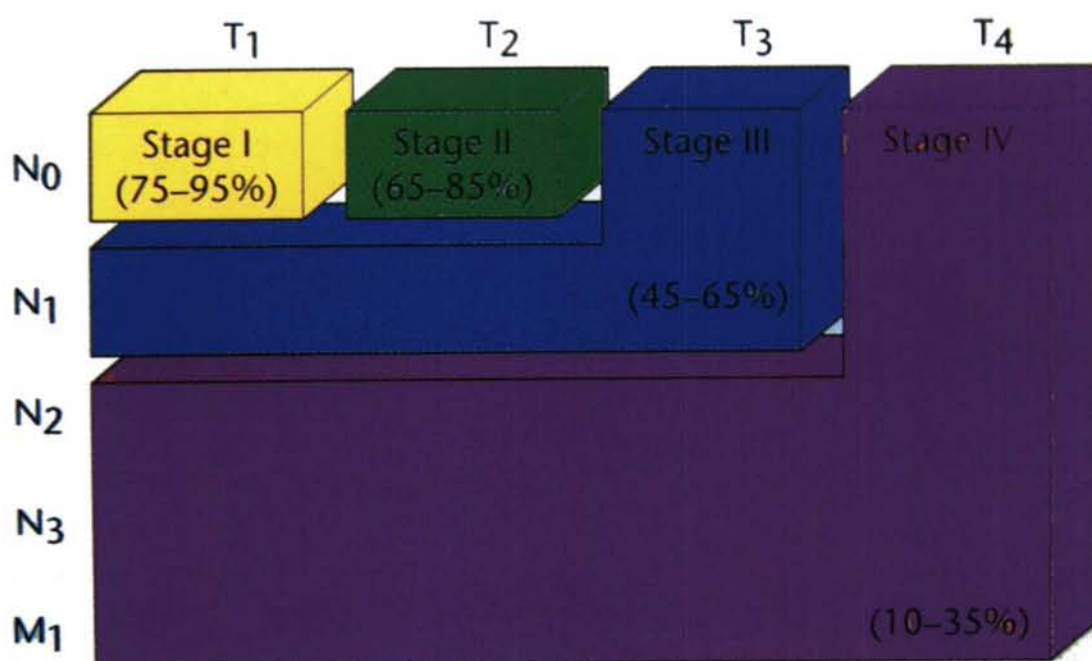
Es imprescindible realizar un seguimiento periódico a los pacientes tratados de cáncer oral y orofaríngeo, con una exploración exhaustiva para descartar o diagnosticar precozmente la presencia de recidivas locoregionales, metástasis a distancia, o aparición de segundos tumores primarios.

La frecuencia de las visitas de seguimiento ha sido ampliamente debatida en el pasado. Los estudios epidemiológicos más recientes revelan que aproximadamente el 85 por ciento de las recidivas ocurren durante los dos primeros años, y que menos del 5 por ciento se presentan después del tercer año del tratamiento<sup>41,42</sup>. Basándonos en estos datos, existe un cierto consenso entre la mayor parte de los autores de que el paciente debe ser controlado cada 4 a 6 semanas durante el primer año, a intervalos de 2 meses durante el segundo año, cada 3 o 4 meses durante el tercer año, y a intervalos de 6 meses a partir de entonces<sup>43</sup>.

### **1.1.13. Resultados**

El factor más importante que condiciona los resultados a largo plazo del tratamiento del cáncer de cavidad oral es el estadio de la enfermedad en el momento de su presentación<sup>2</sup>. En tumores en estadios precoces se pueden preveer excelentes resultados de curación. Sin embargo, si el paciente ha desarrollado afectación de ganglios linfáticos cervicales por el tumor, los porcentajes de curación descienden de forma alarmante<sup>44-47</sup>.





**Figura 10.** Tasas de supervivencia por estadios del carcinoma epidermoide de cavidad oral y orofaringe. Serie del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nueva York.

El desarrollo de metástasis a distancia está también más correlacionado con la afectación tumoral de adenopatías cervicales que con el tamaño del tumor primario<sup>46,48</sup>. Los pacientes con extensa afectación cervical a múltiples niveles, y en particular en la región supraclavicular y los que presentan invasión extracapsular, son los que tienen mayor riesgo de desarrollar metástasis a distancia.

La terapia combinada de exéresis quirúrgica radical de la masa tumoral y radioterapia complementaria ha conllevado un incremento significativo de los índices de curación en estadios avanzados de carcinoma escamoso de cavidad oral<sup>49</sup>. Esta combinación de técnicas también ha producido una alteración en los patrones clásicos de fracaso terapéutico. En el momento actual, casi un tercio de los pacientes con cáncer oral avanzado que no se curan es porque desarrollan metástasis a distancia, lo que les provoca la muerte. La localización



más frecuente de esas metástasis sistémicas es en pulmón, seguido de hueso, hígado y cerebro<sup>48-50</sup>.

Las tasas de curación en oncología de cabeza y cuello han experimentado un continuo y progresivo incremento durante los últimos 40 años, probablemente debido a la mejora de las técnicas quirúrgicas, la combinación de modalidades terapéuticas, la realización de tratamientos electivos en cuellos negativos<sup>51,52</sup>, o la utilización de radioterapia adyuvante postoperatoria en pacientes con estadíos avanzados<sup>2</sup>.

En el momento actual, las principales tendencias evolutivas y de investigación clínica en cuanto al manejo del cáncer de cabeza y cuello se dirigen más a reducir la morbilidad y mejorar la calidad de vida que a conseguir mejores resultados de supervivencia. En este sentido, estamos asistiendo a un desarrollo interesante de la técnica del estadiaje cervical mediante biopsia del ganglio centinela para prevenir la realización de vaciamientos cervicales innecesarios<sup>53,54</sup>.

#### **1.1.14. Factores pronósticos en cáncer oral y orofaríngeo**

Se han descrito numerosos factores que inciden en mayor o menor medida en el pronóstico de los pacientes oncológicos de cabeza y cuello, y que podríamos distribuir en tres grandes apartados: factores pronósticos relacionados con el enfermo, factores relacionados con la neoplasia, y factores que influyen en la respuesta terapéutica.

##### **1. Factores pronósticos relacionados con el enfermo.**

- Edad: Los pacientes jóvenes y muy mayores tienen peor pronóstico<sup>8-12</sup>.
- Sexo: En la literatura médica se describe que los varones tienen peor pronóstico que el sexo femenino<sup>5,13</sup>.
- Factores socioeconómicos.

- Estado clínico o "Performance status": Los pacientes con mayor índice de Karfnosky en el momento de iniciar el tratamiento tienen mejor respuesta, especialmente a la quimioterapia, y una supervivencia más prolongada.
- Estado inmunológico: Se ha intentado identificar aquellos factores que predicen la respuesta terapéutica y la supervivencia. Aunque no se ha encontrado relación significativa con el número total de linfocitos en sangre periférica<sup>55,56</sup>, ni con subpoblaciones linfocitarias, cuando se comparan las características fenotípicas de los linfocitos que infiltran el tumor y de los que infiltran los ganglios linfáticos, se ven algunas diferencias: los ganglios tienen menos linfocitos T8 que el tumor, y mayor cantidad de linfocitos T4, con una relación T4/T8 mayor en el ganglio que en el tumor o en sangre periférica, lo que implica una ausencia relativa tanto de linfocitos T supresores como citotóxicos, ausencia de la actividad NK (natural killer), y escasa capacidad para generar linfoquinas activadas<sup>57</sup>. Schantz y Goepfert encontraron una menor incidencia de metástasis en pacientes con mayor actividad NK, siendo esta diferencia estadísticamente significativa<sup>58</sup>.

Por otro lado, las inmunoglobulinas séricas están elevadas con frecuencia en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello<sup>59,60</sup>. Aunque las bases fisiopatológicas de este hallazgo no están claras, parece que los niveles elevados de inmunoglobulinas, particularmente de IgA, en pacientes previamente no tratados, comporta un mal pronóstico<sup>59,60</sup>. Los niveles de IgE parecen relacionarse con un mejor pronóstico.

- Fármacos: En los últimos tiempos existen varias investigaciones sobre la influencia de determinados fármacos en la incidencia de cáncer oral y en su evolución. El más destacado es el del equipo del Hospital Norwegian Radium de Oslo (Noruega), dirigido por el Profesor Jon Sudbo<sup>61</sup>, que han estudiado el papel preventivo de los



AINE en procesos oncológicos. Entre sus hallazgos destaca que el uso prolongado de AINE reduce el riesgo de cáncer oral en fumadores y exfumadores en un 53 por ciento. La magnitud del efecto protector es comparable al que produce dejar de fumar. Sin embargo, este efecto protector frente al cáncer oral no se traduce en un incremento de la supervivencia, dado que el uso prolongado de AINE duplica el riesgo de mortalidad por causa cardiovascular. En su estudio, 42 consumidores de AINE (16 por ciento) murieron por accidente cardiovascular, comparado con el 7 por ciento de los que no los utilizaban<sup>61</sup>.

## **2. Factores pronósticos relacionados con la neoplasia.**

- Localización del tumor: En líneas generales, cuanto más posterior es el tumor, peor es su pronóstico.
- Tamaño del tumor primario: A mayor diámetro tumoral, peor es el pronóstico. Los pacientes con un grosor tumoral menor de 5 mm tienen una mejor supervivencia que aquellos en los que el grosor es mayor, independientemente del estadio tumoral. Respecto a la profundidad que se considera como un factor de mal pronóstico, existen bastantes discrepancias entre los diferentes autores, aunque se suele considerar el límite de 3 mm<sup>62,63</sup>.
- Afectación de ganglios cervicales: Posiblemente sea el factor pronóstico de mayor relevancia en la práctica clínica, en cuanto a resultados terapéuticos a largo plazo. Aquellos pacientes con afectación ganglionar demostrada por histología y más de tres ganglios afectados tienen el doble de posibilidades de presentar metástasis a distancia que aquellos pacientes sin afectación ganglionar<sup>46</sup>. Además, el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nueva York fue el primero en sugerir que el nivel cervical al que se encuentra el ganglio positivo es un importante factor pronóstico. Vieron también su relación con el fracaso del tratamiento en el cáncer



oral: la supervivencia a los 5 años era del 45% para el nivel I, y del 18% para el nivel VI. Ningún paciente con afectación del nivel V sobrevivía a los 5 años.

La invasión de la cápsula ganglionar aumenta alrededor de tres veces el riesgo de metástasis a distancia. Aquellos ganglios mayores de 3 cm son los que invaden la cápsula con más frecuencia<sup>64</sup>.

- Presencia o ausencia de metástasis a distancia.
- Estadío global del tumor: Un 60% de los pacientes con tumor clínicamente localizado sobrevive a los 5 años, frente a un 30% de los que tienen metástasis regionales, y a un 11% de los que tienen metástasis a distancia.
- Grado de diferenciación histopatológica del tumor: Los tumores peor diferenciados tienen un pronóstico más sombrío. Los tumores más diferenciados se asocian con menor frecuencia de afectación linfática y con menor tasa de recurrencia tumoral.
- Velocidad de crecimiento tumoral.
- Profundidad de infiltración, o espesor del tumor.
- Contenido de ADN celular: Mediante técnicas de citometría de flujo se ha estudiado el contenido de ADN celular y se ha encontrado que las neoplasias de región oral y maxilofacial que tienen un patrón diploide con un bajo índice de marcado celular tienen mejor pronóstico que los tumores no diploides (aneuploides y tetraploides).

Se han investigado otros factores pronósticos que se determinan también por medio de citometría de flujo como es el volumen nuclear, y también se ha visto que es un factor pronóstico significativo<sup>65</sup>.

- Factores celulares y moleculares:
  - Oncogenes: Se han encontrado mutaciones de oncogenes que tienen relación directa con el desarrollo de procesos neoplásicos en el área de cabeza y cuello, y con su pronóstico. Algunos de los más estudiados son el oncogen RAS, el MYC, el

C-ERB B1, o el PRAD-1. En otros capítulos del presente trabajo se estudian con más profundidad.

- Virus: También se han estudiado múltiples cepas virales en relación con el cáncer de cavidad oral, especialmente el virus de Epstein-Barr, con relación etiológica directa con el carcinoma nasofaríngeo, y el virus del papiloma humano. Su significación pronóstica no está totalmente aclarada y está siendo objeto de numerosos estudios, que serán revisados en profundidad en el capítulo de Oncobiología.
- Genes supresores: El gen supresor p53 es una proteína nuclear, localizada en el cromosoma 17, encargada de la regulación negativa de la proliferación celular y de la supresión del fenotipo maligno. La mutación de este gen lleva a una sobreexpresión que lo hace detectable y que permite la transformación maligna de distintas líneas celulares. Cerca de un 62% de los tumores de cabeza y cuello muestran una sobreexpresión del gen p53<sup>66</sup>. Su significación pronóstica no está totalmente definida en la actualidad, y en diferentes estudios no se ha encontrado relación entre la expresión del gen p53 y el estadio tumoral, la probabilidad de recurrencia, la presencia de metástasis ganglionares, ni la supervivencia global<sup>67,68</sup>. Sin embargo, Watling et al lo correlacionan con el grado histológico, aunque no con el estadio<sup>69</sup>.

El gen supresor RB (gen asociado al retinoblastoma) también puede estar alterado en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello, sobre todo por la formación de complejos con el virus del papiloma humano y la proteína E7. Los métodos que determinan la sobreexpresión del gen p53 también determinan la del gen RB.

En el cromosoma 3p se han identificado otros genes supresores que parecen tener un papel importante en los tumores de cabeza y cuello.

- Marcadores inmunológicos: Se está realizando un gran esfuerzo para desarrollar marcadores en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, que se asocien al pronóstico tumoral, especialmente en relación con antígenos de membrana y con inmunocomplejos circulantes. Los estudios disponibles son todavía preliminares.

### **3. Factores que influyen en la respuesta terapéutica.**

Los factores pronósticos relacionados con el tratamiento son similares para la cirugía, radioterapia o quimioterapia. Cuando se considera una única modalidad de tratamiento, el factor pronóstico más importante es tener una respuesta completa al mismo. En el caso de la cirugía, el factor más favorable es tener un tumor bien circunscrito, que haya sido completamente resecado con márgenes tumorales macro y microscópicamente libres. Para el tratamiento con radioterapia o quimioterapia, el factor más importante para prolongar la supervivencia es una regresión completa clínica o radiológica del tumor<sup>70</sup>.

Algunos de los factores pronósticos que influyen en la respuesta terapéutica ya han sido valorados anteriormente:

- Localización del tumor.
- Características del tumor primario.
- Estadío tumoral.
- Morfología tumoral:
  - Grado de diferenciación histológica.
  - Grado de queratinización.
  - Número de mitosis.
  - Patrón de crecimiento.
  - Invasión linfática y vascular.
  - Respuesta inflamatoria.



- 
- Performance status: Cuando se usa poliquimioterapia para la enfermedad recurrente y metastásica, sólo el "performance status" se asocia con una alta tasa de respuesta a la quimioterapia. El tratamiento previo con cirugía y/o radioterapia afecta la vascularización tumoral, y puede disminuir la efectividad de la quimioterapia.
  - Enfermedades asociadas.
  - Respuesta inicial al tratamiento quimioterápico y/o radioterápico.
  - Tipo de respuesta a quimioterapia: remisión completa, parcial, no respuesta.
  - Tipo de quimioterapia: Número de ciclos.

En conclusión, el manejo de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello, aunque sea recompensante, con frecuencia también es complejo y frustrante. Requiere enorme diligencia por parte del cirujano, así como un esfuerzo organizado y cooperativo de un equipo multidisciplinario en el que varias especialidades se ven involucradas. Este esfuerzo comienza en la primera visita del paciente, y continúa para el resto de su vida.

## 1.2. CANCER DE LENGUA

### 1.2.1 Introducción

El cáncer oral es actualmente uno de los diez tipos de cáncer más frecuentes en el mundo, constituyendo alrededor del 3 por ciento de todos los tumores malignos en los países occidentales. Se puede afirmar que uno de los mayores desafíos terapéuticos, no sólo para el cirujano maxilofacial sino para la Cirugía oncológica en general, es el carcinoma de cavidad oral y orofaringe, en su mayor parte debido a su pobre pronóstico y a las mutilaciones y desfiguraciones que la enfermedad o su tratamiento radical generan en un área de tan especial relevancia social como es la boca y la cara.

Dentro de la cavidad oral, la lengua como órgano, y las patologías que la afectan, constituye su máxima representación. La lengua es la localización más frecuente del cáncer de cavidad oral, si exceptuamos el labio inferior.

### Perspectiva histórica

La primera evidencia escrita de lo que podría tratarse de un cáncer de lengua se halla en los papiros de Ebers, que datan de unos 1500 años a.C. En estos papiros se habla de unas úlceras erosivas de la encía y de una "enfermedad de la lengua", sin especificar que se tratase de un proceso neoplásico. Hipócrates (460-370 a.C.), en su *Prorrheticon*, describe las úlceras crónicas del borde de la lengua, refiriéndose a ellas como frecuentes, y relacionándolas con el roce continuado con dientes de bordes cortantes<sup>71,72</sup>. Celso, en el año 178 d.C., se refiere en términos similares. Galeno no hace referencias específicas al cáncer de lengua, pero menciona los "tumores duros" entre las lesiones orgánicas de la lengua. En siglos posteriores, Avicena (980-1037 d.C.) y Ambrosio Paré (1517-1590 d.C.) hicieron comentarios breves sobre el cáncer de lengua. Las referencias literarias se hacen más frecuentes en el Renacimiento tardío, coincidiendo históricamente con la generalización de los

hábitos de tabaco, alcohol y especias de condimentos, así como el aumento de expectativas de vida de la población y las epidemias de sífilis<sup>71</sup>. Estos hechos ya empiezan a tener importancia como factores etiológicos o predisponentes para el cáncer de lengua.

El tratamiento del cáncer de lengua estuvo proscrito desde los tiempos de Hipócrates hasta el siglo XVI, por considerarlo "noli me tangere". Así, Abulcasis (1013-1107 d.C.), Guy de Chauliac (1368 d.C.) y Lanfranc (1490 d.C.) recomendaron "no tocar" este tipo de úlceras linguales dolorosas, duras y corrosivas<sup>71</sup>.

Para el comienzo del siglo XVIII se habían producido numerosos intentos de remoción quirúrgica de los tumores linguales. Marchetti, en 1664, mediante cauterización, fue probablemente el que primero intentó una extirpación del cáncer de lengua<sup>73</sup>. Para soslayar las dificultades técnicas y las complicaciones provenientes de la cirugía, en especial la hemorragia, se idearon diferentes técnicas de glosectomía, entre las que destaca la estrangulación o ligadura progresiva de la lengua para evitar hemorragias y provocar la isquemia y necrosis de la porción deseada<sup>73</sup>.

Langenbeck, en 1819, realizó resecciones en cuña de cánceres de lengua y labio, usando suturas para lograr hemostasia. Se considera que llevó a cabo las primeras exéresis modernas y sistematizadas del cáncer de lengua mediante escalpelo<sup>71</sup>.

Roux, en 1839, fue el primero en describir la remoción de un epiteloma de lengua con ligadura previa de la arteria lingual<sup>73</sup>.

Whitehead, en 1881, con la asistencia de anestesia mediante cloroformo, sistematizó la operación de glosectomía por vía intraoral, sin apertura de la mejilla ni de la mandíbula para su abordaje<sup>71</sup>.

Butlin, entre 1881 y 1908, intervino a 107 pacientes con cáncer de lengua, informando que el 55% de ellos estaban vivos sin recurrencia en periodos comprendidos entre 3 y 20 años<sup>71</sup>.

En 1895, Roentgen descubrió los rayos X, y 2 años más tarde los esposos Curie descubrieron el Radium. Rápidamente se publicaron informes



sobre la utilidad de estas emisiones radiactivas en la práctica médica, y en concreto en el tratamiento del cáncer. En el año 1902, Beck y Cleaves informaron por separado del tratamiento del cáncer de lengua mediante rayos X<sup>71</sup>. En el año 1904, Bulkley, Courtin y Bergonne, y Hallopean, informaron de forma independiente del tratamiento del cáncer de lengua por medio del Radium<sup>71</sup>.

En el transcurso del siglo XX se ha producido un notable desarrollo en las técnicas de diagnóstico y tratamiento de estos tumores, con la cirugía y la radioterapia como métodos con potencial curativo, y con la quimioterapia como terapia adyuvante. El último aldabonazo ha venido dado por el desarrollo de las técnicas de microcirugía, que se han instaurado desde la última década del siglo XX, y que han revolucionado la filosofía de manejo quirúrgico en cuanto a la necesidad de reconstruir los grandes defectos primarios y permitir una mejoría considerable de la calidad de vida residual de los pacientes.

## Embriología de la lengua

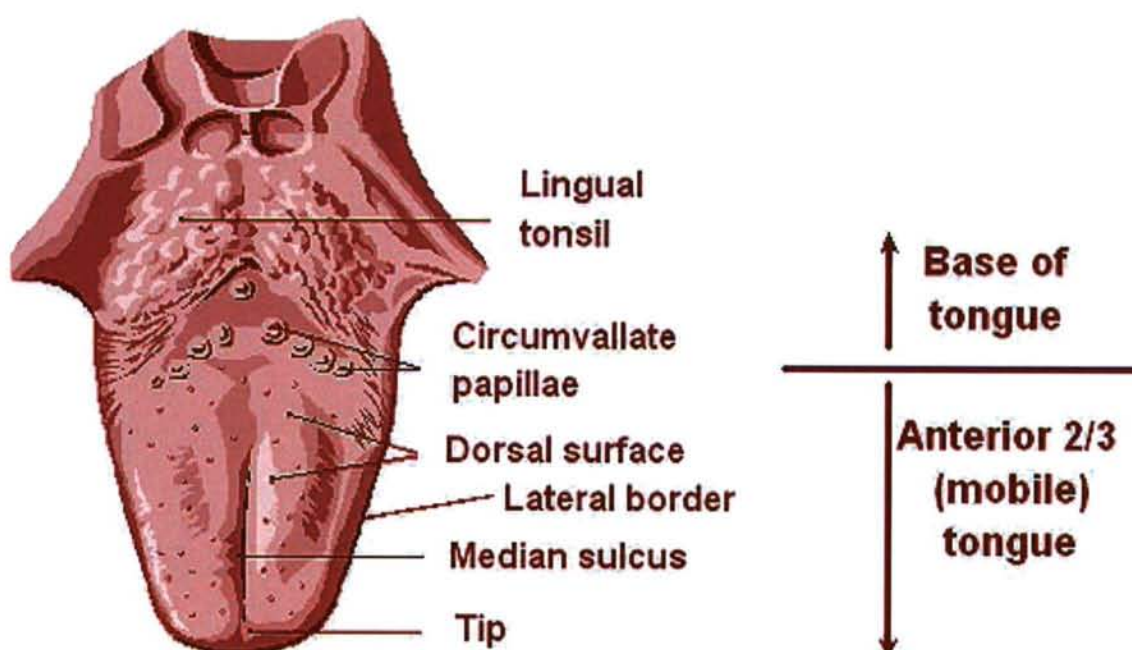
La lengua suele aparecer aproximadamente en la cuarta semana del desarrollo embrionario como dos protuberancias linguales laterales y una prominencia medial que se originan en el primer arco branquial. Otro abultamiento en la línea media, la eminencia hipobranquial, está constituido por mesodermo del segundo, tercero y cuarto arcos branquiales. Por último hay un tercer abultamiento medio derivado de la porción posterior del cuarto arco branquial que señala el desarrollo de la epiglotis.

Las protuberancias linguales laterales crecen paulatinamente y exceden en volumen al tubérculo impar, fusionándose entre sí, formando los dos tercios anteriores de la lengua. La porción posterior de la lengua tiene su origen en los arcos segundo, tercero y cuarto.

## Consideraciones anatomofisiológicas

En el dorso de la lengua encontramos el surco terminal en forma de V, en cuyo vértice se encuentra el *foramen cecum* (agujero ciego). Esta V delimita

anat6micamente el 6rgano lingual en una porci3n oral, la *lengua oral o lengua m3vil*, que ocupa los dos tercios anteriores, y una porci3n far4ngea que ocupa el tercio posterior, la *base de la lengua*.



**Figura 11.** Esquema anat6mico de la lengua.

La porci3n far4ngea o *base de la lengua* se localiza posterior a los pilares anteriores del velo palatino. Forma parte de la pared anterior de la orofaringe, y la mucosa que la recubre refleja hacia las am4gdalas palatinas y pared far4ngea lateralmente, y hacia los pliegues glosopigl3ticos posteriormente. La superficie dorsal de la porci3n far4ngea contiene gran n3mero de f3liculos linfoides que van a constituir la am4gdala lingual.

La superficie dorsal de la porci3n bucal o *lengua m3vil* es fina y se adhiere 4ntimamente al tejido muscular, estando recubierta de un gran n3mero de papilas. La mucosa que recubre la cara inferior o p3lvica de la porci3n oral es lisa y de color p3rpura, igual que la del resto de la cavidad oral. Se refleja hasta el suelo de la boca y las enc4as, y en la l4nea media se relaciona con el suelo de la boca y la porci3n interna de la mand4bula a trav4s del frenillo lingual.



La disposición de la musculatura lingual permite su amplia movilidad. Existen músculos intrínsecos que discurren libremente por el cuerpo lingual, sin inserciones óseas, como el músculo transverso, músculo longitudinal superior e inferior, y músculo vertical. Otros músculos linguales se denominan extrínsecos por originarse fuera del órgano lingual, a partir de inserciones óseas, como el estilogloso, geniogloso, hiogloso y palatogloso. El septum lingual separa los músculos de la lengua de ambos lados, aunque no consigue delimitar la irrigación ya que ésta se entrecruza a través del septum gracias al circuito ranino. Del mismo modo, el retorno linfático de ambas hemilenguas no es totalmente independiente, sino que se entrecruzan vías linfáticas contralateralmente, hecho que desempeña un papel fundamental en la diseminación linfática de los tumores que asientan en esta localización.

La inervación motora de la lengua corre a cargo del *nervio hipogloso*. La sensibilidad de la porción bucal de la lengua es mediada por el *nervio lingual*, rama del V par craneal, mientras que el sentido del gusto es recogido por el *nervio cuerda del tímpano*. En la porción faríngea, tanto la inervación sensitiva como la sensitivo-gustativa son vehiculadas por el *nervio glossofaríngeo*. La porción más posterior de la lengua, al igual que la epiglotis, reciben inervación del nervio laríngeo superior, rama del *nervio vago*, lo cual hace entender su origen embrionario a partir del cuarto arco branquial.

La arteria carótida externa irriga la lengua a través de la arteria lingual. El retorno venoso tiene lugar a través de la vena del mismo nombre hacia el tronco tirolinguofacial, para terminar posteriormente en la vena yugular interna. El sistema linfático, como ya hemos mencionado, juega un papel esencial en la patología oncológica de la lengua, ya que drena tanto homolateralmente como de forma cruzada. Esto explica las metástasis linfáticas contralaterales de los tumores malignos de lengua, especialmente los que asientan en las proximidades de la línea media y los de gran tamaño. Los linfáticos de la punta de la lengua drenan a los ganglios de la región submental, mientras que el drenaje linfático de los dos tercios laterales linguales se dirige a los ganglios submandibulares y yugulodigástricos.



La duplicación de estructuras musculares, vasos sanguíneos, linfáticos y nervios asegura que la pérdida estructural y/o funcional de un lado de la lengua no se vea acompañada de la pérdida total de su función.

### **Vascularización de la lengua**

La lengua posee una vascularización abundante. Recibe ramos de las arterias palatina inferior, faríngea inferior, y sobre todo de la arteria lingual. Todas son ramas mediatas o inmediatas de la arteria carótida externa. La arteria lingual nace de la parte anterior de la carótida externa y se dirige hacia la musculatura lingual para darle aporte sanguíneo. A nivel del asta mayor del hioides se separa de la arteria lingual un ramo fino denominado arteria dorsal de la lengua, que se dirige hacia arriba distribuyéndose en el espesor y la mucosa de la base de la lengua. A este nivel se establecen anastomosis entre las arterias de ambos lados. También como rama colateral de la arteria lingual se desprende la arteria sublingual, rama descendente que después de irrigar la glándula sublingual y los músculos hiogloso, geniogloso y genihioideo, se divide en dos ramas terminales, una superior y una inferior. En ocasiones, uno de los ramos de la superior puede alcanzar el frenillo y anastomosarse con la del lado opuesto. La rama terminal de la arteria lingual se denomina arteria ranina, y se dirige de forma oblícua de atrás a delante y de abajo a arriba hacia la punta lingual, dando en su trayecto 10 o 12 colaterales, y estableciendo una importante red anastomótica en la punta lingual. El rafe medio de la lengua separa totalmente, a efectos vasculares, ambos lados de la lengua, a excepción de la punta lingual<sup>72</sup>.

El drenaje venoso de la lengua se realiza a través de la vena lingual, que está conformada por la convergencia de las venas profundas, las venas dorsales y las venas raninas. Las venas profundas acompañan a la arteria ranina en número de dos, constituyendo frecuentemente un verdadero plexo alrededor. De ordinario, están poco desarrolladas. Las venas dorsales forman detrás de la "V" lingual un plexo notable que camina entre la mucosa y los músculos subyacentes. Las venas raninas están situadas a cada lado del frenillo lingual,

donde son visibles por transparencia de la mucosa. De la convergencia de estas tres venas se forma la vena lingual, que puede desembocar en la vena yugular interna aisladamente o después de fusionarse con la vena facial, o la vena facial y la tiroidea superior conformando el tronco tirolinguofacial.

### **Drenaje linfático de la lengua**

Se distingue una red linfática mucosa superficial y una red muscular profunda<sup>72</sup>. El plexo linfático mucoso es abundante y cubre como un entramado la mucosa lingual. Los linfáticos musculares profundos forman abundantes plexos ordenados alrededor de los vasos sanguíneos, y comunican con la red mucosa.

Los linfáticos eferentes de la lengua se dividen en 4 grandes grupos colectores: a) los linfáticos de la punta o apicales, b) los linfáticos de los bordes o marginales, c) los linfáticos de la base, y d) los linfáticos centrales.

Los linfáticos apicales, generalmente en número de dos, caminan al lado del frenillo de la lengua, y drenan de manera inconstante en los ganglios submentonianos, y constantemente en los ganglios yuguloomohioideos de ambos lados.

Los colectores laterales drenan en los ganglios submaxilares, yugulodigástricos y yugulocarotídeos homolaterales.

Los troncos centrales descienden a través del septum lingual, pueden pasar a ambos lados del cuello, y terminan unos en los ganglios submaxilares y otros en los ganglios de la cadena yugular interna, principalmente en los yugulocarotídeos, aunque también drenan en los yugulodigástricos y en los yuguloomohioideos.

Los troncos posteriores o de la base lingual llevan el drenaje de la lengua orofaríngea hacia los ganglios yugulodigástricos y a los ganglios laterales faríngeos de ambos lados del cuello.

Es importante reseñar que la linfa de la mitad de la lengua puede ir a los ganglios del lado opuesto por cuatro vías según Rouviere: 1) por mediación de



la red mucosa, 2) por los linfáticos apicales, 3) por los troncos centrales, y 4) por los troncos posteriores o de la base lingual<sup>74</sup>.

Los *grupos ganglionares* del cuello que tienen importancia en relación con la recogida del drenaje linfático de la lengua móvil son los siguientes:

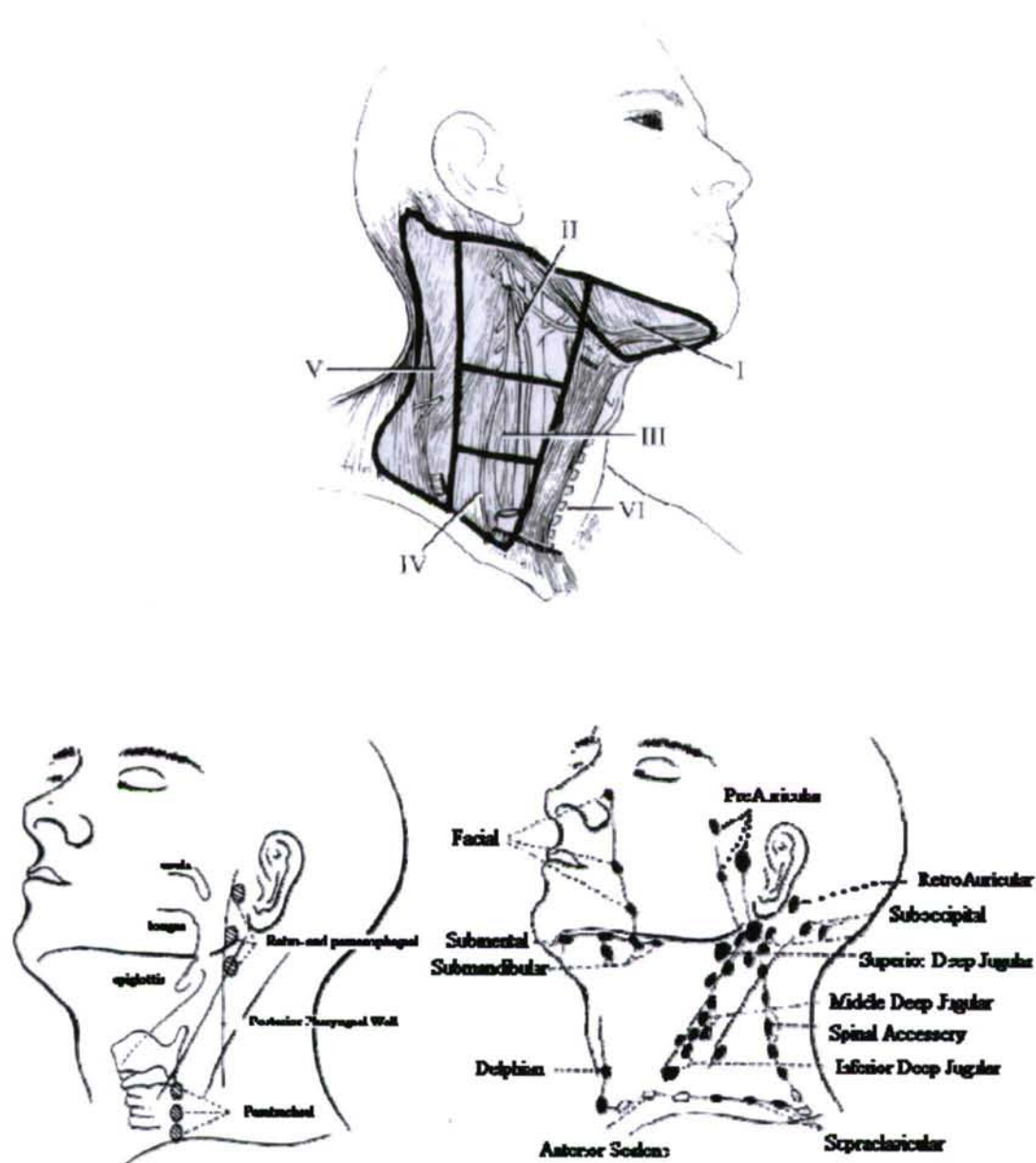
- *Ganglios submentonianos*. En número de 2 a 3 se localizan en el triángulo formado entre los vientres anteriores de los músculos digástricos y el hueso hioides.

- *Ganglios submaxilares*. Se encuentran en el borde inferior de la mandíbula, superficiales a la glándula submaxilar. Pueden dividirse en anteriores o preglandulares, prevasculares y retrovasculares. Según la nomenclatura actual internacionalmente aceptada, constituyen el nivel I cervical junto a los ganglios submentonianos.

- *Ganglios linfáticos de la cadena yugular*. Estos ganglios se subclasifican en función de la altura a la que se encuentren. Así se distinguen:

- Ganglios subdigástricos o yugulodigástricos. En esta localización existen varios ganglios, al más grande de los cuales se le denomina ganglio principal o ganglio subdigástrico de Küttner. Corresponden al nivel II cervical de la nomenclatura internacional.
- Ganglios yugulocarotídeos. Se localizan a nivel de la bifurcación de la arteria carótida primitiva, e inferiores al cuerpo del hioides. Corresponden al nivel III cervical.
- Ganglios supraomohioideos o yuguloomohioideos. Se localizan en el entrecruzamiento del vientre anterior del músculo omohioideo y la vena yugular interna. Vienen a representar el nivel IV cervical de la clasificación de la AJCC.





**Figura 12.** Distribución de los ganglios linfáticos cervicales.

### Sentido del gusto

Los cuatro sabores fundamentales son *dulce*, *salado*, *ácido* y *amargo*. Los receptores gustativos están localizados fundamentalmente en las papilas gustativas, con la siguiente distribución:

Sabor amargo	Región de la V lingual
Sabor ácido	Regiones laterales
Sabor salado	Punta y bordes laterales
Sabor dulce	Punta lingual

El gusto está mediado por los nervios facial, glossofaríngeo y neumogástrico o vago. La innervación gustativa de los dos tercios anteriores de la lengua procede del nervio cuerda del tímpano, rama del nervio facial (VII par craneal), que llega a la lengua con el nervio lingual, rama del nervio trigémino (V par craneal). El nervio glossofaríngeo (IX par craneal) conduce la información gustativa de la base lingual. La rama interna del nervio laríngeo superior, rama del nervio neumogástrico o vago (X par craneal), lleve aferencias gustativas procedentes de la orofaringe, laringe, epiglotis y esófago.

### **Papel de la lengua en la deglución**

La contribución de la lengua a los mecanismos del habla y de la deglución la convierten de manera incuestionable en la estructura más importante de la cavidad oral.

La musculatura extrínseca de la lengua está conformada por cuatro pares de músculos: hioglosos, estiloglosos, palatoglosos y genioglosos. Estos músculos actúan junto con la musculatura intrínseca para asistir en la deglución. El estilogloso tira de la lengua hacia arriba y atrás, mientras que el hiogloso aplanar la lengua a base de traccionarla hacia el hioides, de esta forma propulsando el bolo alimenticio desde la cavidad oral hacia la orofaringe. Los genioglosos, además de servir de inserción a la mandíbula a nivel de los tubérculos geni, traccionan la lengua hacia delante. La funcionalidad de los genioglosos tras una resección lingual con o sin reconstrucción va a determinar en gran medida la función residual global que va a tener esa lengua a partir de entonces.

Este conjunto muscular constituye una masa que contribuye a la propulsión del bolo alimenticio hacia la región faríngea.

La saliva también contribuye a este mecanismo. La secreción de las glándulas salivares se recolecta fundamentalmente en el suelo de la boca y se concentra en la línea media anterior. A intervalos regulares, cuando se acumula un volumen suficiente de saliva para estimular el acto reflejo de la deglución, la punta de la lengua bombea el bolo de saliva con un movimiento de inmersión hacia delante en el interior del acúmulo salivar para transferirlo hacia el dorso lingual. A partir de ahí es arrastrado hacia la parte posterior de la lengua que, mediante un movimiento de elevación, lo empuja contra el paladar duro y lo sitúa en una plataforma lingual inclinada hacia atrás para desplazarlo hacia la orofaringe<sup>75-77</sup>.

En la masticación de alimentos, la lengua está dirigiendo constantemente la posición del bolo alimenticio en la boca, de forma más marcada con la punta lingual. Una vez formado el bolo alimenticio, y entremezclado con la saliva, la comida es desplazada hacia la orofaringe por un mecanismo idéntico al descrito.

### **Papel de la lengua en la fonación**

La lengua también desempeña un papel primordial en el mecanismo de la articulación y modulación de la palabra, lo que la convierte en un órgano fundamental en la vida de relación.

La parte de la lengua que contribuye de forma más significativa a la fonación es el tercio anterior. La pronunciación adecuada de muchos sonidos se realiza por la presión de la superficie dorsal de la lengua, en las proximidades de la punta, contra la mucosa gingival situada inmediatamente por palatino de la concavidad de los incisivos superiores y el cingulo de los caninos. El resto de la lengua desempeña un papel menos determinante en el mecanismo del habla.

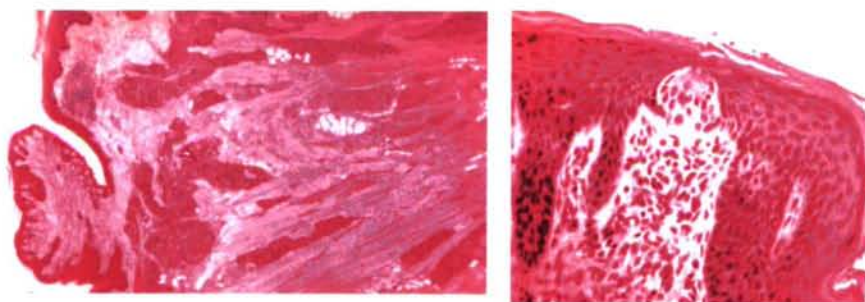
Los pacientes con resecciones parciales de lengua, como es el caso de las glossectomías subtotales o totales por cáncer de lengua, sufren un menoscabo evidente de la inteligibilidad de su habla, especialmente si no se



realiza una reconstrucción funcional adecuada de ese defecto lingual<sup>78,79</sup>. Incluso esas alteraciones fonéticas se han descrito ante lesiones transitorias del nervio lingual<sup>80</sup>.

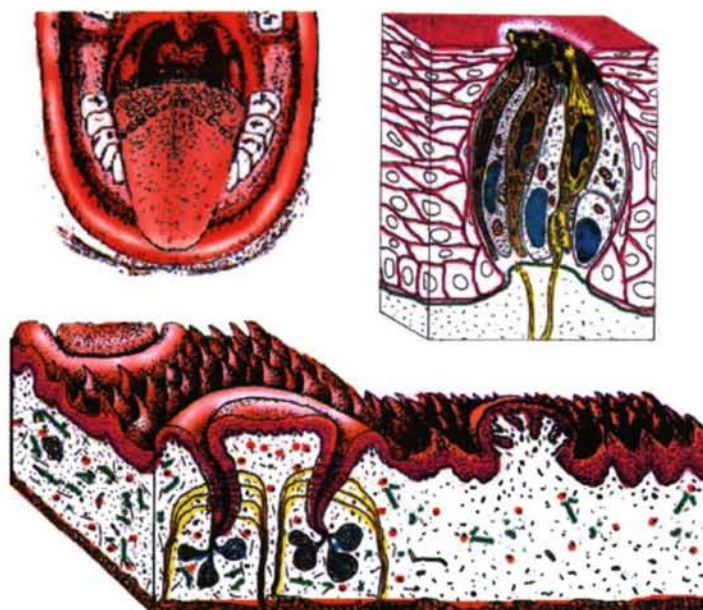
## La mucosa lingual

La mucosa oral normal está compuesta de un epitelio escamoso estratificado que cubre un tejido conectivo fibroso denso. En la mayor parte de la cavidad oral es un epitelio no queratinizado. En el dorso de la lengua, al igual que ocurre en la encía, este epitelio es ligeramente queratinizado. No hay apéndices cutáneos, y el epitelio está compuesto de tres capas: germinativa, espinosa y córnea. En ocasiones, si hay hiperqueratosis importante, aparece un estrato granuloso.



**Figura 13.** Histología de la mucosa lingual.

En la lengua, alrededor de todo su borde lateral, se objetiva una línea de demarcación que separa el dorso del resto de la lengua. Por debajo de esa línea, en las superficies lateral y ventral, la membrana mucosa es lisa y móvil, con una apariencia y características similares al suelo de boca, mejillas y labios. La superficie dorsal es rugosa por la presencia de papilas. Su membrana mucosa está íntimamente adherida a la musculatura subyacente, con una ausencia virtual de submucosa entre ambas. Se distinguen tres tipos fundamentales de papilas por toda su superficie: filiformes, fungiformes y caliciformes.



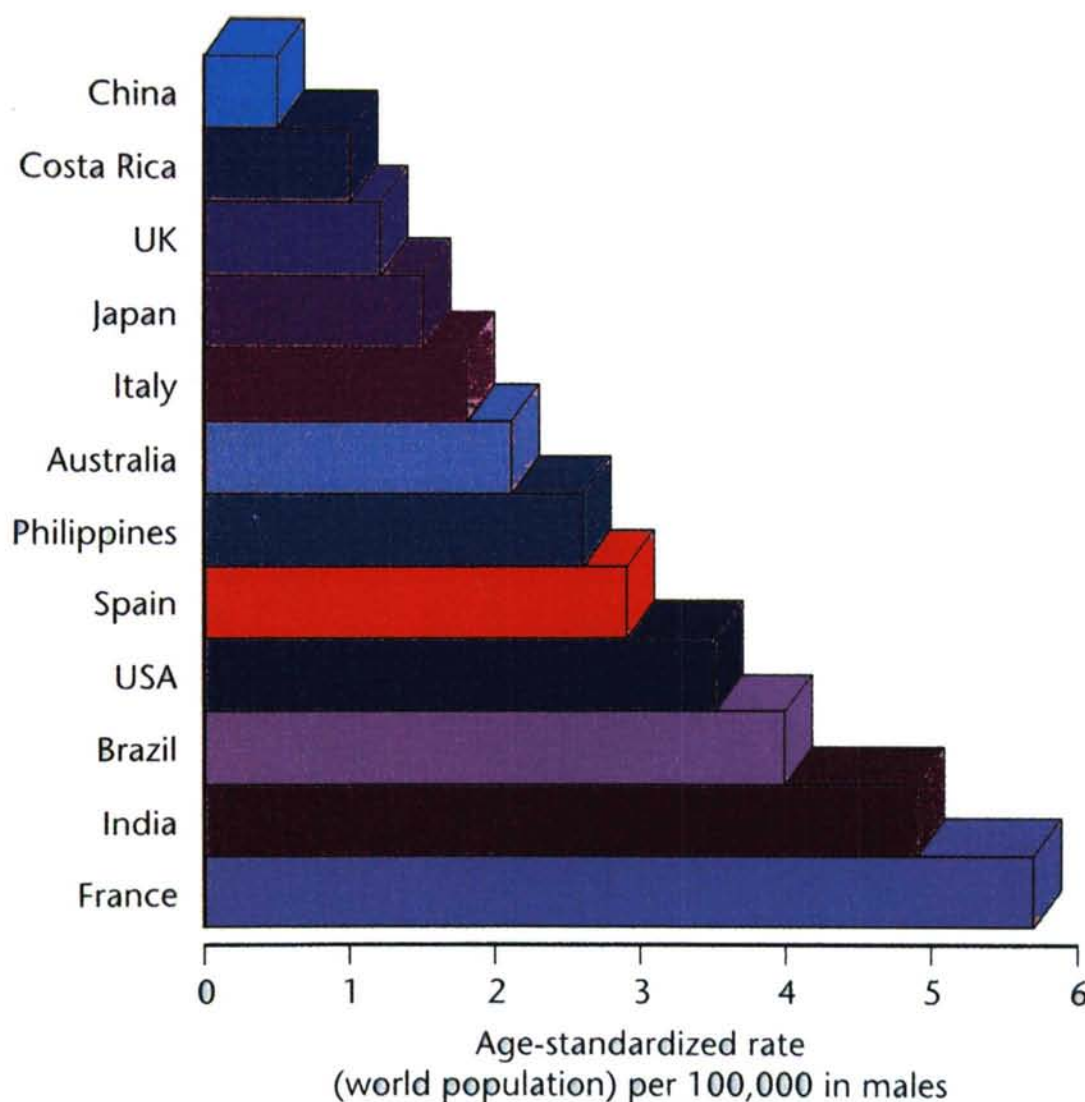
**Figura 14.** Papilas linguales.

### 1.2.2. Epidemiología del cáncer de lengua

Los datos de la U.S. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) durante los años 1975 a 1998 describen una incidencia del cáncer de lengua oral incluso mayor que la del cáncer de labio, cada uno de ellos representando aproximadamente el 20% del total de cánceres de cavidad oral y orofaringe<sup>15</sup>. Estos datos de la SEER también sugieren un incremento del 5% al 10% entre la población de raza blanca. Por el contrario, entre la población negra se ha encontrado una disminución de la incidencia de un 5% al 14%. Asimismo se ha demostrado un aumento de la incidencia en pacientes de 40 años de edad y más jóvenes. Una vez más, el tabaco y el abuso del alcohol se han mostrado como factores de riesgo significativo para el desarrollo de este cáncer.

El carcinoma epidermoide de lengua es una enfermedad predominantemente de varones. En la década de los 90 se decía que tan sólo un 10% ocurrían en mujeres. Sin embargo, la incidencia relativa en mujeres se

está incrementando progresivamente, aparentemente en relación con la progresiva incorporación de la mujer a la adicción a hábitos nocivos como el tabaquismo y alcoholismo. A pesar de ello, persiste como una enfermedad de predominio masculino.



**Figura 15.** Incidencia del cáncer de lengua en diferentes países. Fuente: Cancer Incidence in 5 Continents Vol. VII, 1997.

### 1.2.3. Factores etiológicos

La etiología del cáncer oral es desconocida. Se han identificado varios agentes que tienen relación con el desarrollo del cáncer oral, bien por medio de



un efecto directo sobre la mucosa o bien haciéndola más sensible a virus oncogénicos u otros agentes carcinógenos. Parece que los factores externos y los internos o intrínsecos se combinan, de manera que magnifican su potencial para provocar un cambio inicial irreversible (*iniciación*) que únicamente da lugar a un tumor cuando se estimula la división celular (*promoción*). Entre los distintos factores etiológicos, de importancia desigual, se encuentran:

### **1. Tabaco.**

La relación entre tabaco y cáncer oral está firmemente establecida. Existe la duda en cuanto al efecto físico del calor (sobre todo en fumadores "candela" que fuman al revés) añadido al efecto químico del tabaco, el principal, ya que es el factor etiológico más importante, también en mascadores de tabaco. De hecho la incidencia de cáncer de lengua es alarmantemente alta en la India, en gran medida asociada al hábito de mascar un tipo de tabaco.

El efecto del tabaco es dosis-dependiente en relación al tiempo y a la cantidad fumada. El riesgo es mayor para los fumadores de cigarrillos que para los de pipa, cigarro puro, o tabaco mascado o esnifado. El riesgo disminuye a la mitad en los ex-fumadores a partir de los tres años.

### **2. Alcohol.**

No existen dudas de que el consumo de alcohol es un factor de riesgo de carcinoma oral, y de que los efectos de tabaco y alcohol consumidos juntos aumentan el riesgo de forma mayor que una simple adición de efectos (cocarcinógeno y sinérgico). No existen evidencias claras de que un tipo concreto de bebidas alcohólicas representen más riesgo que otras.

### **3. Agentes infecciosos.**

- *Cándida*: Este hongo es un hallazgo frecuente en las leucoplasias nodulares, que presentan una tasa de degeneración maligna mayor que otras leucoplasias, posiblemente asociado a la capacidad de la *Cándida* de producir carcinógenos químicos.

- *Treponema Pallidum*: En la era preantibiótica se consideraba la sífilis como un importante factor predisponente para la leucoplasia y el cáncer oral. De hecho, en publicaciones del pasado se decía que el cáncer de dorso lingual presentaba una relación etiológica estrecha con la presencia de sífilis<sup>81</sup>, pero en la actualidad dicha asociación es inusual. Actualmente se considera que la única relación existente es entre la glositis atrófica de la sífilis terciaria y el carcinoma de lengua, quizás debido a la mayor sensibilidad del epitelio atrófico a los agentes carcinogénicos.

- *Virus del papiloma humano (VPH)*: No existe una relación causal entre el VPH y el cáncer oral similar a la existente con el cáncer de cuello de útero, pero se ha demostrado la presencia de ADN viral en el cáncer oral, aunque también en lesiones benignas y en la mucosa oral sana.

- *Virus del herpes simple (VHS)*: Existen evidencias de que el VHS podría actuar en conjunción con otros factores. Se encuentran títulos elevados frente a este virus en los pacientes con carcinoma oral respecto a la población general.

- *Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)*: Existe un estudio que afirma que la prevalencia del cáncer oral es mayor en pacientes con SIDA, independiente y no asociado a la presencia de leucoplasia vellosa, pero existe la sospecha de que se trata de una asociación casual<sup>82</sup>. Los pacientes con SIDA presentan mayor tendencia a desarrollar linfomas no Hodgkin y sarcomas de Kaposi, éste último con notable tendencia a afectar a la mucosa palatina.

#### **4. Deficiencias nutricionales.**

- *Disfagia sideropénica (síndrome de Plummer-Vinson o de Patterson-Kelly)*: Es una condición precancerosa que afecta fundamentalmente a mujeres nórdicas que presentan disfagia y anemia ferropénica, y que puede asociarse a atrofia del epitelio oral, predisponiendo a desarrollar carcinomas orales. El mecanismo es similar al de la glositis sífilítica: aumento de la sensibilidad de la mucosa atrófica a los agentes carcinogénicos. El tratamiento sustitutivo con hierro mejora la anemia ferropénica y la disfagia, pero se desconoce si disminuye el riesgo de degeneración maligna.



- *Déficit de vitamina A*: Se han descrito niveles bajos de vitamina A en pacientes con cáncer oral, pero se desconoce si es un factor causal o una consecuencia del cáncer. Existe un único estudio que afirma que la ingesta adecuada de frutas frescas puede actuar como un factor protector frente al desarrollo del cáncer oral<sup>83</sup>.

## 5. Factores dentales.

La *mala higiene dental* y los *traumatismos crónicos* sobre la mucosa de origen dentario se han citado durante muchos años como factores implicados en la etiología del cáncer oral, aunque la evidencia de esta asociación se basa fundamentalmente en la experiencia clínica más que en estudios randomizados.

## 6. Luz solar.

Los rayos ultravioletas solares están claramente implicados en el desarrollo de cáncer de labio. Su asociación etiológica con el cáncer de lengua es obviamente insignificante.

## Lesiones precancerosas

Se considera *lesión precancerosa* aquella lesión benigna con alteraciones morfológicas, que tiene un riesgo mayor de lo normal (>5%) de transformación maligna. Este concepto es independiente de las características clínicas e histológicas. Supone reversibilidad y no implica el desarrollo de una neoplasia.

La OMS define *condición precancerosa* como un estado general (enfermedad o hábito) asociado significativamente con un riesgo elevado de desarrollar cáncer. No implica alteraciones clínicas.

Actualmente se consideran lesiones premalignas aquellas alteraciones de la mucosa oral que tienen un potencial intrínseco de malignización demostrado. Entre ellas se encuentran:

- Leucoplasia o leucoplaquia.
- Eritroplasia de Queyrat.
- Candidiasis hipertrófica crónica.



Otro grupo de condiciones de la mucosa oral, aunque no son en sí mismas premalignas, están asociadas a una incidencia superior de cáncer oral en las personas que las presentan:

- Fibrosis submucosa oral.
- Glositis sífilítica.
- Disfagia sideropénica (síndrome de Plummer-Vinson o de Patterson-Kelly).
- Epidermolisis bullosa distrófica.
- Xeroderma pigmentosum.

Existe un grupo de condiciones orales en las que persiste la duda acerca del tipo de relación con el cáncer oral, causal o casual:

- Liquen plano oral.
- Lupus eritematoso discoide.
- Disqueratosis congénita.

Existe un grupo de condiciones de la mucosa oral consideradas erróneamente en el pasado como lesiones premalignas, en las que actualmente se descarta una relación causal con el cáncer oral:

- Estomatitis nicotínica.
- Línea alba de mordida de la mucosa oral (morsicatio buccorum).
- Leucoedema.
- Nevus blanco esponjoso.

#### **1.2.4. Clínica**

Con mucha frecuencia, el cáncer de lengua es asintomático. La musculatura intrínseca de la lengua propicia escasa restricción al crecimiento del tumor. Por ello, demasiados tumores de lengua crecen considerablemente antes de empezar a producir sintomatología. La infiltración local del suelo de boca, base de lengua y pilares amigdalinos es muy común ya en ese momento.

El cáncer de lengua se presenta frecuentemente como una masa indolora o una lesión ulcerativa que no cicatriza posteriormente a un traumatismo menor. Con el desarrollo progresivo de la enfermedad, muchos pacientes experimentan dolor local, otalgia refleja ipsilateral, y molestias de diversa consideración a nivel de los maxilares.

La principal localización de estos tumores de lengua se registra en la unión del tercio medio y el tercio posterior del borde lateral de la lengua oral. Aproximadamente el 30% de estos pacientes ya presentan metástasis linfáticas cervicales homolaterales. Cuando la tumoración se localiza en la región medial de la lengua, las metástasis linfáticas ya suelen ser cervicales bilaterales. La primera estación para esas metástasis linfáticas cervicales suele encontrarse en los niveles I a III, especialmente en los ganglios superiores de la cadena yugular (nivel II). Es rara la presencia de skip metástasis en niveles IV y V<sup>84</sup>, aunque se han descrito en la literatura con una incidencia mayor en la lengua que en otras localizaciones primarias del tumor<sup>85</sup>. En la literatura se encuentran artículos de revisión que registran aproximadamente un 5% de carcinomas epidermoides de lengua con metástasis en niveles III-IV cervicales sin afectación de niveles I-II<sup>86</sup>.

Los carcinomas de la lengua oral son frecuentemente bien diferenciados. En general se diagnostican más precozmente que los de base de lengua, que producen escasa sintomatología en estadios iniciales y son más difíciles de explorar. Su pronóstico suele ser más sombrío, puesto que, además, a menudo son pobremente diferenciados y se presentan en un estadio más tardío.

Cuando el tumor es diagnosticado en estadios precoces pueden permanecer visibles estigmas del estado precursor, aunque con frecuencia ya han sido engullidos por la masa tumoral. La línea de unión entre la mucosa lisa de la cara ventral de la lengua y la mucosa rugosa y papilada del dorso lengua es una de las localizaciones intraorales donde la leucoplasia tiende a ser verrucosa, y en esa línea la verrucosidad suele incrementarse a medida que exploramos áreas más posteriores. Cuando el carcinoma de células escamosas se localiza a ese nivel, la línea de leucoplasia suele verse alargada



anteriormente desde la zona ulcerativa. En las raras situaciones de premalignidad multifocal extendida, la distribución en parches de áreas de mucosa atrófica mezclada con áreas de eritroleucoplasia es muy característica, y esta apariencia presagia una infiltración tumoral extensiva y difusa una vez que el tumor se manifiesta.

Con mayor frecuencia la mucosa presenta un aspecto normal excepto en el foco tumoral. La extensión de este foco es variable. Unas veces es un área pequeña; otras es una zona de mayor extensión, incluso pudiendo sugerir que el proceso degenerativo neoplásico ha podido acontecer sobre un campo de mucosa. El estudio histológico de estos casos revela con frecuencia la existencia de un área de displasia bastante extensa alrededor del foco tumoral. En muchas ocasiones ese campo de mucosa premaligna es considerablemente más extenso que la sospecha del clínico en una primera exploración.

La musculatura lingual proporciona un volumen considerable de tejido blando uniforme sobre el que se extiende el tumor, prácticamente sin oponer resistencia alguna. La infiltración tumoral tiende a dispersarse de forma radiada desde el foco inicial, aunque la morfología macroscópica del tumor se ve influenciada por el tipo clínico (ulcerativo o proliferativo) y la superficie de extensión.

Aunque este patrón de infiltración tumoral sea frecuentemente de forma centrífuga, esa infiltración tiende a desplazarse en sentido posterior en la mayoría de las ocasiones, generalmente con una extensión submucosa más allá de las primeras expectativas. El cirujano debe ser consciente de ello para conseguir un margen de radicalidad quirúrgica. Cuando esta extensión posterior de la tumoración involucra la región de la base de la lengua y la musculatura extrínseca, la limitación de la motilidad lingual es indefectible. Esta fijación lingual también es frecuente cuando la tumoración infiltra el suelo de boca.

La infiltración tumoral de la musculatura lingual provoca una restricción de la funcionalidad de la misma, por lo tanto reduciendo la movilidad lingual. El área de tejido infiltrado se comporta como un bloque inmóvil de tejido en el seno de la lengua, permitiendo exclusivamente su movilidad por la actuación de



las fibras musculares no invadidas por tumor. En fases avanzadas de infiltración la fijación de la lengua es total.

Este efecto de fijación lingual resulta más llamativo cuando la tumoración asienta en el dorso lingual, en su zona central. En estos casos se genera una masa central de tejido inmóvil rodeada por musculatura normal, produciendo un efecto de levantamiento de los bordes laterales y punta lingual.

El patrón más frecuente de infiltración es de un lado a otro de la lengua. De esta forma, la musculatura lingual contralateral permanece funcional hasta estadios avanzados de la enfermedad. Este es uno de los factores que contribuyen a que la lengua a menudo conserve su capacidad de propulsión de forma sorprendente durante un periodo de tiempo considerable, a pesar de presencia de tumoraciones bastante grandes.

Cuando el tumor se localiza en la porción posterior de la lengua, la progresión laterocaudal hacia el suelo de la boca provoca la infiltración precoz del músculo pterigoideo interno en su zona de inserción mandibular. Este tipo de infiltración provoca un efecto de fijación lingual en estadios más precoces, con tumoraciones más pequeñas, además de la correspondiente limitación de la apertura mandibular – trismus-. Es también uno de los factores por los que clásicamente se consideraba la resección parcial mandibular como elemento casi obligatorio de la cirugía para conseguir una resección radical del carcinoma de lengua. A partir de los trabajos de Marchetta et al<sup>87</sup> se considera que si existe invasión del periostio mandibular, ésta acontece por invasión directa del tumor. Incluso en tumores grandes, mayores de 5 cm de diámetro, no existía invasión perióstica si se encontraba tejido microscópicamente normal entre la tumoración y la mandíbula. Posteriores estudios demostraron que el periostio actúa a modo de barrera para la invasión tumoral, de modo que si no existe invasión del mismo no es necesaria la resección mandibular para conseguir una radicalidad en la exéresis tumoral.

En el tercio posterior de la lengua, los tumores tienden a diagnosticarse en estadios más avanzados debido a su menor accesibilidad a la visión y detección por parte del paciente. De hecho, en no pocas ocasiones se detectan

estas tumoraciones en el curso de una exploración que se inicia tras la palpación de una adenopatía cervical sospechosa de metástasis linfática.

Se considera de forma regular que los tumores localizados en el tercio posterior tienen peor diferenciación histológica que los de los dos tercios anteriores de la lengua. Esto ha sido considerado como uno de los factores que contribuyen a su peor pronóstico. Otros factores que sin duda contribuyen a ese pronóstico más sombrío son la inaccesibilidad de esa región anatómica, la mayor demora en el diagnóstico, y su incapacidad tradicional para tratar esos tumores quirúrgicamente, de forma que se confiaba excesivamente en el tratamiento radioterápico como terapia curativa.

Por otro lado, comparativamente con la región anterior, los tumores posteriores de la lengua se desarrollan en la proximidad de estructuras anatómicas importantes como son las amígdalas, el paladar blando y la orofaringe. En particular, la proximidad anatómica entre la base de la lengua y la epiglotis y el hueso hioides no resulta accesible a la palpación digital del clínico explorador. Estas regiones son infiltradas incluso en estadios precoces de la tumoración. De esta forma, estos tumores son considerados rápidamente como avanzados, e incluso algunos grupos de trabajo los consideran inoperables aunque se encuentren en fases precoces de crecimiento y sean de tamaño relativamente pequeño.

Tanto en regiones anteriores como posteriores de la lengua, la ausencia relativa de sintomatología resulta especialmente remarcable. Lo máximo que refieren un gran número de pacientes en su primera visita es un cierto discomfort, y muchos incluso ni siquiera esto hasta que la ulceración se encuentra desarrollada y sufre irritación por el roce de dientes prominentes o mellados.

En la base de la lengua es más frecuente que el paciente refiera molestias vagas a la deglución. Curiosamente este variable discomfort en el mecanismo deglutorio es bien tolerado hasta grados muy remarcables, cuando el tamaño tumoral ya es considerable.



El dolor es una sintomatología que suele aparecer de forma tardía. Puede estar localizado en el área tumoral, o ser referido, normalmente hacia la región auricular (otalgia refleja).

En resumen, el cuadro del cáncer de lengua suele ser silente, comenzando en muchos casos con una lesión leucopásica de larga evolución. La lesión pasa por las fases de induración, crecimiento vegetante, ulceración y sangrado. A medida que la lesión progresa se puede instaurar un dolor fijo, constante e intenso, irradiado a hemicara y oído homolateral. Puede acompañarse de sialorrea, disfagia y disartria.

### **Diseminación metastásica**

La lengua tiene la reputación de ser un órgano que desarrolla metástasis a los ganglios cervicales de forma precoz y muy frecuente. En la práctica, sin embargo, la presencia de adenopatías metastásicas acontece en casos de tumores primarios bien establecidos, generalmente de cierto tiempo de evolución. De todas formas, nos encontramos excepciones con presencia de metástasis precoces y tardías, siendo las primeras desgraciadamente más frecuentes que las segundas.

Como la mayor parte de los carcinomas epidermoides de lengua asientan en sus bordes laterales, el patrón característico de metástasis es ipsilateral, contralateral o bilateral. Los canales de drenaje linfático de la lengua se dirigen hacia los dos lados del cuello, por lo que no es infrecuente encontrar diseminación tumoral cervical bilateral. Lo que realmente interesa desde el punto de vista quirúrgico es determinar si esas vías linfáticas son funcionalmente activas. La diseminación linfática de los carcinomas epidermoides se produce de forma embólica, por lo que el patrón de drenaje linfático es el que determina el patrón metastásico. La experiencia clínica demuestra que, en los casos típicos, sólo los canales de drenaje linfático homolateral son funcionantes. Las metástasis contralaterales del carcinoma epidermoide de lengua son extremadamente raras. La secuencia habitual de acontecimientos es que las metástasis cervicales contralaterales aparecen



clínicamente cuando el drenaje linfático ipsilateral se encuentra bloqueado por la enfermedad neoplásica, por la cirugía ablativa cervical, o por la fibrosis originada por la radioterapia.

La secuencia de acontecimientos que conlleva el desarrollo de metástasis cervicales contralaterales tiene también implicaciones en el comportamiento tumoral y su manejo terapéutico. La aparición de adenopatías cervicales contralaterales generalmente es posterior al tratamiento de la lesión primaria y los ganglios linfáticos cervicales ipsilaterales, ya sea mediante cirugía o con radioterapia. La subsecuente aparición de diseminación cervical contralateral puede significar una de dos cosas: el tumor metastásico ya estaba presente en esos ganglios desde el principio, al menos microscópicamente, o bien que la diseminación metastásica ocurrió durante o posteriormente al tratamiento inicial. Si esta segunda hipótesis es cierta, el clínico debe asumir que existe persistencia de tumor residual en la lesión primaria lingual. Por ello algunos autores consideran que la aparición de metástasis cervicales contralaterales eleva el índice de sospecha de persistencia tumoral o falta de radicalidad en la exéresis de la lesión primaria lingual.

La localización del cáncer en la lengua, bien sea anterior o posterior, determina en gran medida qué ganglios cervicales van a ser más frecuentemente infiltrados. Es rara la afectación de ganglios submentales en el cáncer de lengua, aunque los vaciamientos cervicales que se practican incluyen el nivel I.

Los tumores del borde lateral de lengua suelen metastatizar en los ganglios submandibulares o directamente en los ganglios de la cadena yugular, es decir, niveles II y III cervicales. La afectación inicial de los ganglios de la cadena yugular alta es lo que tradicionalmente se refiere como ganglio yugulodigástrico. Menos frecuente es la afectación específica de ganglios de cadena yugular baja, los ganglios yugulo-omohioideos. Cuando existe afectación ganglionar contralateral, tanto si es inicial como si es tardía, el patrón de distribución tumoral es similar.

En los raros casos de tumores de línea media de lengua, las metástasis linfáticas pueden naturalmente aparecer en ambos lados del cuello, aunque es sorprendente lo frecuente que es la presencia unilateral de las mismas.

### **1.2.5. Diagnóstico**

Ya nos hemos referido sobradamente en capítulos anteriores del presente trabajo a los aspectos diagnósticos del cáncer de cavidad oral. Evidentemente, todas esas consideraciones son válidas para el carcinoma epidermoide de lengua. En este apartado, simplemente recalcar una vez más la importancia del diagnóstico precoz para el pronóstico del enfermo, y la obligatoriedad de realizar una biopsia incisional para confirmar histológicamente el diagnóstico. Esa muestra tisular tiene que ser obtenida de la periferia de la lesión, o de zonas centrales de la lesión asegurándose de que contenga tejido viable.

En el caso de carcinomas altamente queratinizados y carcinomas verrucosos, con frecuencia, ocurre que una biopsia superficial puede no proporcionar un volumen adecuado de tejido representativo de la superficie de la lesión, y se puede obtener un falso negativo ante un carcinoma invasivo. Por tanto, ante situaciones clínicas en las que se objetiva abundante componente queratínico en la superficie de una lesión exofítica, la biopsia debe ser obtenida de la zona invasiva adyacente o de la profundidad de la lesión, más que de la región superficial. Si el resultado de la biopsia no muestra carcinoma ante una lesión clínicamente sospechosa de malignidad, se recomienda tomar una nueva biopsia hasta confirmar el diagnóstico histológico.

Histológicamente, el carcinoma epidermoide de lengua se origina a partir de las células de la capa basal o del estrato espinoso. Generalmente mantiene contacto con la mucosa y muestra un crecimiento tumoral en forma de hojas o nidos tumorales con presencia de células disqueratósicas, y con conservación de formación de queratina y de los puentes de unión. Las células son grandes, con núcleos vesiculares, abundante citoplasma y puentes intercelulares. Es

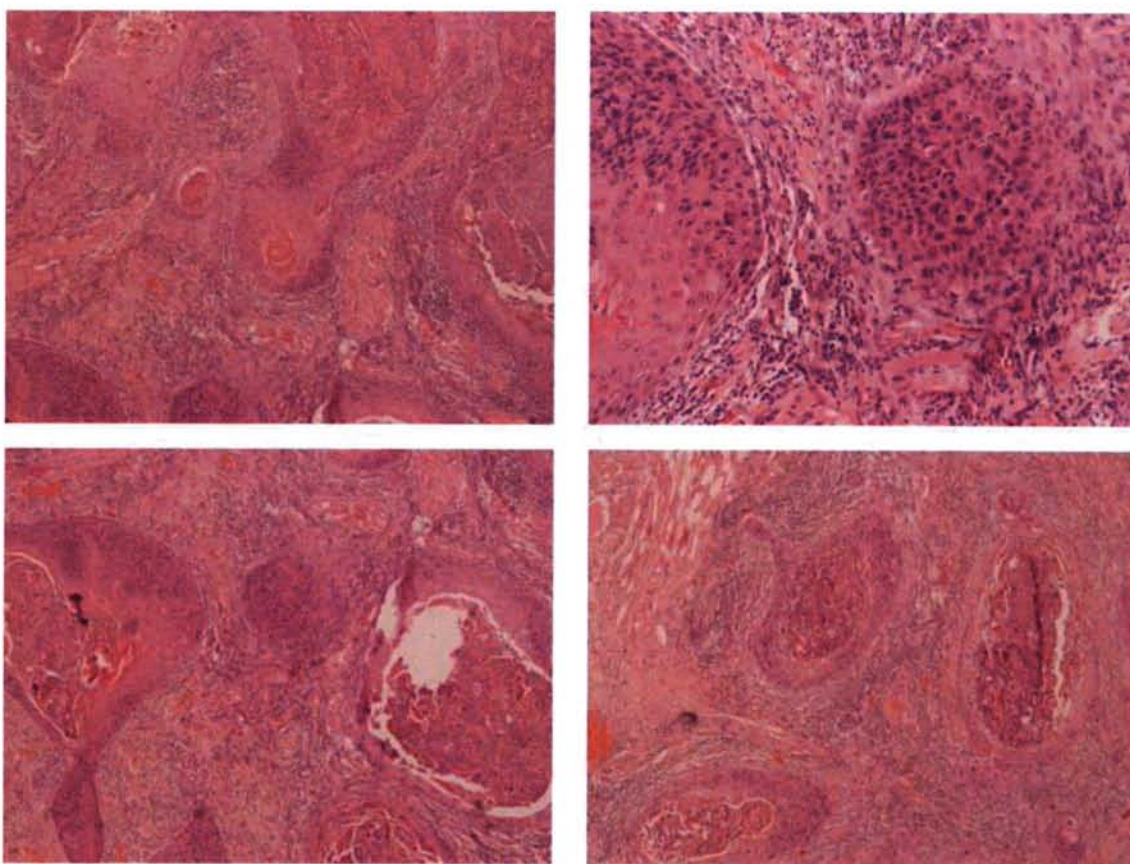


característica los globos de queratinización, formación de perlas córneas. La diferenciación del tumor es hacia la queratinización, y deben clasificarse los tumores en bien diferenciados, moderadamente diferenciados o pobremente diferenciados. De forma alternativa pueden clasificarse siguiendo los estadios histológicos de Broders en 4 grados:

- Grado I: menos de 25% de células indiferenciadas.
- Grado II: menos de 50% de células indiferenciadas.
- Grado III: menos de 75% de células indiferenciadas.
- Grado IV: más de 75% de células indiferenciadas.

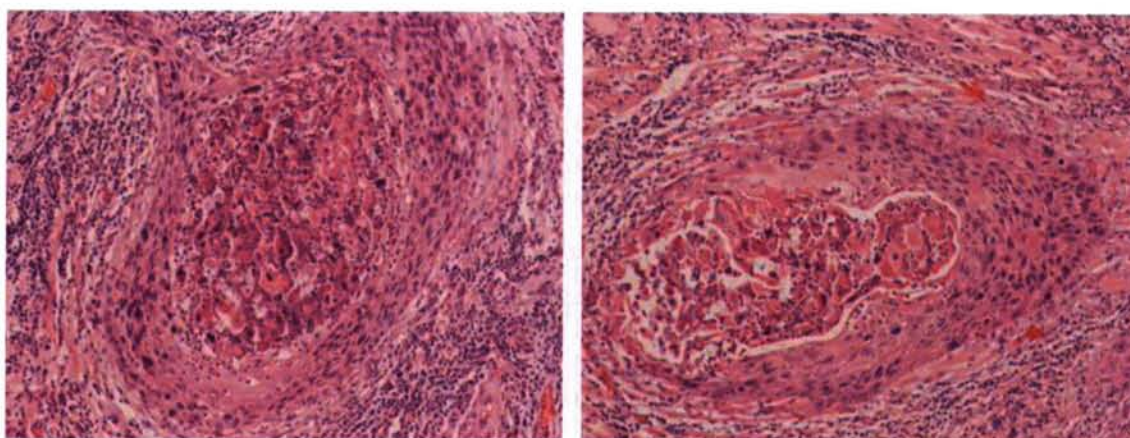
Cuanto más indiferenciados, producirán menos queratina y serán más malignos, con más mitosis atípicas y ausencia de puentes intercelulares.

En la submucosa se observa intenso infiltrado linfocitario y aumento de la vascularización.



**Figura 16.** Fotos histológicas de nidos de carcinoma epidermoide infiltrante, formados por células de aspecto Malpighiano, con atipia y con necrosis en el centro de los nidos.





**Figura 17.** Fotos microscópicas (campo de 20x) de algunos nidos de carcinoma infiltrante.

### 1.2.6. Tratamiento

Tanto la resección quirúrgica como la radioterapia, ya sea de forma individualizada o una combinación complementaria de ambas, son terapias aplicables con fines curativos en el carcinoma epidermoide de lengua. En la actualidad, el papel terapéutico de la quimioterapia permanece incierto y es fruto de numerosas investigaciones.

Los tumores pequeños y superficiales son igualmente curables con cirugía y con radioterapia. Por ello, su aplicación como terapia única es el tratamiento de elección ante tumores en estadios precoces (I y II). Los estudios multicéntricos con series amplias parecen demostrar resultados ligeramente mejores en estos estadios precoces con cirugía que con radioterapia<sup>2</sup>. Cuando se estudian los objetivos finales del tratamiento, como supervivencia libre de enfermedad, y se obtienen resultados comparables con ambas modalidades terapéuticas, la decisión dependerá de otros factores como complicaciones, conveniencia del paciente, aceptación del mismo, costes o secuelas a largo plazo con cada tratamiento.

Los pacientes con cáncer de lengua en estadios avanzados requieren claramente un tratamiento combinado de cirugía y radioterapia

complementaria. La radioterapia en combinación con la cirugía puede ser utilizada tanto preoperatoriamente como postoperatoriamente. Existen indudables ventajas y desventajas en cada caso, que ya han sido consideradas en capítulos anteriores de este trabajo.

### **1.2.7. Pronóstico**

En apartados anteriores se han descrito los aspectos generales que inciden en mayor o menor medida en el pronóstico de los pacientes oncológicos de cabeza y cuello, y que podríamos distribuir en tres grandes apartados: factores pronósticos relacionados con el enfermo, factores relacionados con la neoplasia, y factores que influyen en la respuesta terapéutica.

Estos factores son absolutamente válidos como factores pronósticos en el carcinoma epidermoide de lengua. Sin embargo, en la lengua existen una serie de elementos específicos que condicionan el pronóstico de la enfermedad. Algunos vienen determinados por las particularidades anatómicas de la lengua, y otros por las características clínicas del proceso oncológico en esta localización.

#### **Factores pronósticos específicos del cáncer de lengua**

- *Escasa sintomatología de la enfermedad:* Con frecuencia el carcinoma epidermoide de lengua es asintomático, y se presenta como una masa indolora o con ulceración que no cura tras un trauma menor. A medida que va avanzando la enfermedad aparece dolor. Muchas veces ni siquiera ese dolor es localizado en la lengua, sino que con frecuencia es un dolor reflejo predominantemente a nivel del oído ipsilateral (otalgia refleja). Este dato condiciona que muchos pacientes tarden demasiado tiempo en consultar con el especialista en Cirugía Oral y Maxilofacial. De esta forma, la enfermedad está muy avanzada en el momento del diagnóstico, incluso con presencia de metástasis ganglionares a nivel cervical. Como hemos comentado previamente,



el diagnóstico tardío y la presencia de adenopatías cervicales positivas ensombrece el pronóstico de la enfermedad.

- La musculatura intrínseca de la lengua proporciona *escasa restricción al crecimiento tumoral*. De esta manera, los cánceres de lengua pueden crecer mucho antes de producir sintomatología y ser diagnosticados.

- La *infiltración local* del suelo de la boca, base de lengua y otras regiones anatómicas de la orofaringe como los pilares amigdalinos es muy frecuente en los tumores primarios de lengua móvil.

- Muchos cánceres de lengua asientan en el *borde lateral de la lengua*, predominantemente en la unión del tercio medio y posterior del mismo. Aproximadamente un 30% de estos pacientes se presentan con metástasis cervicales ipsilaterales. Cuando el tumor asienta en la línea media es frecuente la presencia de adenopatías cervicales bilaterales.

- Existe una *alta incidencia de metástasis cervicales ocultas en el carcinoma epidermoide de lengua*, incluso de forma independiente al tamaño de la lesión primaria. Se ha descrito que aproximadamente un 28% a 29% de tumores T1, 43% a 47% de T2, y 56% a 77% de T3 tienen adenopatías cervicales positivas cuando se realiza un vaciamiento cervical funcional<sup>88,89</sup>. Por el contrario, otros autores consideran que la localización particular del cáncer en la lengua no representa un factor predictivo específico del desarrollo de metástasis cervicales<sup>90</sup>.

- Algunos estudios resaltan la importancia pronóstica de la expresión del gen  $p21^{WAF1/CIP1}$ , particularmente en combinación con otros parámetros de apoptosis celular como son la acumulación de p53 o la expresión de Bax y Bcl-2<sup>91</sup>. El gen  $p21^{WAF1/CIP1}$  induce la expresión de la proteína  $p21^{WAF1/CIP1}$ , que inhibe la actividad del complejo kinasa ciclin-dependiente, que bloque la progresión del ciclo celular a nivel de la transición de las fases G1-S. En el cáncer de lengua, la expresión de  $p21^{WAF1/CIP1}$  ha demostrado correlacionarse inversamente con la clasificación T y el estadio clínico, pero no con la clasificación N, la diferenciación tumoral y el índice apoptoico.



## Resultados terapéuticos

La causa más común de muerte en pacientes con cáncer de lengua es la recidiva locoregional<sup>92</sup>. El porcentaje de supervivencia a los 3 años para pacientes con cáncer de lengua inferior a 4 cm es de 70% a 80%. Los pacientes con tumores mayores tienen una supervivencia a los 3 años de tan solo 40% a 50%. Aproximadamente un 30% de pacientes desarrollan segundos tumores primarios. La presencia de adenopatías metastásicas reduce el porcentaje de supervivencia al 15% a 30%. La localización más frecuente de metástasis a distancia es en pulmón<sup>93</sup>.

Algunos estudios sugieren que el cáncer de lengua en pacientes menores de 40 años, por motivos todavía parcialmente desconocidos, tiene un comportamiento más agresivo que en pacientes mayores, y requiere por tanto un abordaje terapéutico más agresivo<sup>94</sup>. Se ha calculado un porcentaje de supervivencia de aproximadamente 33%, y que un 57% de estos pacientes desarrollan recidiva locoregional. Otros autores han comparado la supervivencia del carcinoma de lengua a los 2 años de seguimiento en pacientes más jóvenes de 30 años, 45%, y en pacientes mayores de 30 años, 65%<sup>8,95</sup>. Por el contrario, otros estudios revelan que no existe diferencia significativa en los porcentajes de supervivencia en pacientes jóvenes con cáncer de lengua<sup>96,97</sup>. De hecho, varios autores han demostrado mejores resultados en la supervivencia en pacientes jóvenes, probablemente relacionados con una menor comorbilidad y, por tanto, una mayor capacidad para tolerar regímenes terapéuticos agresivos<sup>12,98,99</sup>.

## 1.3. CARCINOMA EPIDERMOIDE

El carcinoma de células escamosas representa más del 90% de las neoplasias malignas de la cavidad oral. (Figura 6)

### 1.3.1. Biología molecular de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello

Los tumores de cabeza y cuello constituyen una de las neoplasias malignas más frecuentes en nuestro medio, de modo que muchos registros los sitúan en el segundo lugar de incidencia, tan sólo superados por las neoplasias pulmonares. Su frecuencia puede verse acentuada en los próximos años, ya que el tabaco es el principal factor etiológico conocido y, lejos de disminuir su consumo, las mujeres se han incorporado al mismo, al menos en España. El intenso estudio del que han sido objeto estas neoplasias responde no sólo a su elevada incidencia, sino al hecho de asentar en una encrucijada anatómica importante en las funciones digestivas, de fonación y de relación, además de su papel estético. Sin embargo, a pesar de múltiples estudios, las curvas de supervivencia apenas se han modificado en los últimos años, y pocos pacientes se han beneficiado de nuevas modalidades de tratamiento.

Los principales avances acontecidos en el campo de la oncolgía de cabeza y cuello han venido de la mano de un conocimiento más profundo de la biología molecular de estos tumores, algo que ha abierto puertas en el estudio de factores pronósticos y en el planteamiento de posibilidades futuras de tratamiento. Los factores pronósticos son los que tienen una importancia más inmediata, sobre todo ahora, cuando el interés por los mismos está creciendo.

Algunos parámetros relacionados con la biología molecular de los carcinomas de cabeza y cuello ofrecen información relevante sobre su comportamiento clínico y pueden ayudar a identificar a los enfermos con



mayores posibilidades de recidivar, de padecer metástasis o de tener tumores resistentes a las diferentes opciones terapéuticas.

En la biología molecular de los tumores de cabeza y cuello, los principales conocimientos están centrados en cuatro grandes apartados: alteraciones genéticas, defectos en diversas proteínas, papel de las células "normales" que rodean a las células neoplásicas, y otros factores diversos.

## **Alteraciones genéticas**

### **1. Citometría**

Durante los últimos años, la citometría de flujo se ha incorporado al estudio de todas las neoplasias. Básicamente, ofrece información sobre la ploidía y sobre la tasa de división celular, factores directamente relacionados con la velocidad de crecimiento del tumor. En general, un tumor es más agresivo y tiene peor pronóstico cuanto mayor proporción de células aneuploides tiene y cuanto mayor es su tasa de proliferación. Este segundo parámetro, determinado por la proporción de células en fase S del ciclo celular, parece relacionarse mejor que la ploidía con la respuesta al tratamiento y con la supervivencia: éstos son más desfavorables a medida que crece dicha proporción.

Actualmente se está prestando atención a otros datos obtenidos mediante observación directa de las células neoplásicas, concretamente, la medición del volumen nuclear. Esta medida se relaciona con la supervivencia libre de enfermedad y con la probabilidad de recaída (un volumen grande es desfavorable)<sup>100</sup>. Sin embargo, todavía se están perfeccionando las técnicas para determinar el volumen nuclear de un modo estándar y fácilmente reproducible.

Todas estas técnicas presentan un problema común: estudian parámetros que se van a modificar o no dependiendo del tratamiento aplicado. La radioterapia y la quimioterapia sí pueden cambiar el fenotipo de las células tratadas, no así la cirugía. De todos modos, tampoco se sabe con exactitud si esta distinción tiene importancia o no.



## 2. HLA.

La presencia del antígeno de histocompatibilidad B14 aumenta la probabilidad de padecer un carcinoma de cabeza y cuello. Por el contrario, los antígenos DR3 y DR4 ejercen un papel protector; son los primeros HLA conocidos cuya presencia supone un factor favorable<sup>100</sup>.

## 3. Mutaciones de oncogenes.

El papel de los oncogenes en el desarrollo de neoplasias de cabeza y cuello es motivo de numerosas investigaciones. Se han encontrado datos sugestivos en relación con algunos oncogenes:

- *RAS*: Se han encontrado mutaciones de este oncogen en varias lesiones benignas, tales como queratoacantomas, y en carcinomas verrucosos de cabeza y cuello, en pacientes de la India. Esto es menos frecuente en países occidentales, quizá porque no se han estudiado lesiones tan tempranas. También puede deberse a que las lesiones avanzadas pierden la mutación *ras*. Este hecho se ha visto en lesiones celulares de ratón, en donde las mutaciones del oncogen *ras* recurren en casi todos los papilomas premalignos, pero se ven con poca frecuencia en carcinomas más avanzados. No hay estudios concluyentes publicados que asocien las mutaciones del oncogen *ras* con el pronóstico<sup>101</sup>.

- *MYC*: El gen *c-myc* (celular *myc*) está amplificado en un 24% de los pacientes con carcinoma de cabeza y cuello. Se ha visto que los niveles elevados de mRNA y proteína se correlacionan con la supervivencia. No se vieron diferencias entre los grupos de pacientes tratados y no tratados o con recurrencias, y tampoco se encontró correlación con el estadio tumoral.

Todavía está sin resolver si una cantidad elevada de proteína de *c-myc* es la causa o el resultado del cáncer, dado que la mayor cantidad de esta proteína se encuentra en las células en proliferación. A no ser que se pueda demostrar una alteración específica en el ADN, esta proteína puede ser sólo indicadora de un marcado turnover celular, que es una característica de los

tumores más agresivos. Sin embargo, esto no va en contra de su potencial como indicador pronóstico.

- *C-ERB B1*: Este gen codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que es una glicoproteína de superficie celular. Este receptor es estimulado por un polipéptido, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que favorece el crecimiento y la proliferación de las células epidérmicas e inhibe la diferenciación de los queratinocitos. El número de receptores disminuye en las células diferenciadas, mientras que las células con gran número de receptores tienen menos capacidad para entrar en una vía final de diferenciación. En algunos estudios se relaciona la sobreexpresión del receptor con irritantes tales como el tabaco, y con pérdida de diferenciación; por ejemplo, la pérdida de expresión de los antígenos de grupos sanguíneos A, B y H se ve en carcinomas de cabeza y cuello, junto con la sobreexpresión del EGFR.

En pacientes con carcinoma de cabeza y cuello se ve con frecuencia la sobreexpresión del EGFR. Por ejemplo, se ha visto la expresión de este receptor en la mucosa oral y en tumores de glándulas salivares. En la laringe se encuentra sobreexpresión en el epitelio neoplásico pero no en el epitelio normal o con displasia leve o moderada.

La expresión de EGFR parece tener influencia en el comportamiento de tumores de vejiga, esófago, pulmón, mama y estómago. Sin embargo, en los tumores de cabeza y cuello parecen existir discrepancias. Autores como Parttridge y cols<sup>102</sup> estudiaron la expresión del EGFR en papiloma oral y en cáncer de cavidad oral. Encontraron diferencias en la cantidad de receptor entre el epitelio neoplásico y la mucosa normal, pero no encontraron relación entre la expresión del receptor y el comportamiento tumoral. Sólo Miyaguchi y cols encontraron relación entre este receptor y peor pronóstico en pacientes con carcinoma de laringe<sup>103</sup>.

Sin embargo, el método utilizado para determinar la expresión del EGFR es importante ya que hay receptores de alta y baja afinidad, y no todos los métodos de determinación son lo suficientemente cuantitativos<sup>104</sup>.



Otro factor de crecimiento, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), utiliza el mismo receptor que el EGF, aparece en muchas líneas celulares, incluyendo los queratinocitos, y también en distintos tumores. Este factor estimula también la proliferación celular, y algunos tumores lo relacionan con el pronóstico de los tumores de cabeza y cuello.

- *PRAD-1*: Este oncogen está en el cromosoma 11, y forma parte de un gen más amplio que contiene los oncogenes BCL1, INT2 y HST1. Estos genes son importantes en la regulación del ciclo celular. Todos estos oncogenes están amplificados en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, pero sólo PRAD-1 se expresa en el nivel proteico.

Se ha observado que en algunas neoplasias de cabeza y cuello están ampliados genes situados en la región 11q13. El oncogén INT-2 está relacionado con la producción de un factor de crecimiento que interviene en la angiogénesis. Es bien conocido que, en el proceso de metastatización, las células tumorales tienen que asegurar su viabilidad mediante la secreción de sustancias que promueven el crecimiento de vasos sanguíneos. Estos vasos son los encargados de transportar los nutrientes necesarios para que el tumor crezca con éxito. Autores como Somers et al encuentran que la amplificación del oncogen INT2 se correlaciona con la recurrencia tumoral, pero no con el estadio o el grado histológico<sup>105</sup>. Merrit et al demuestran que la amplificación del oncogen INT2 se ve con bastante frecuencia (en un 52% de los tumores de cabeza y cuello), pero a causa del escaso número de pacientes y del corto seguimiento, no se ha visto correlación con el estadio y con el pronóstico<sup>106</sup>.

La frecuente identificación de alteraciones en el cromosoma 11q13 en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello ha sido confirmada por varios estudios. En este cromosoma, además de los genes INT2, BCL1, HST y PRAD-1, que están amplificados en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello, está el gen glutathione S-transferase (GST-g), con importante significado biológico, encargado de la síntesis de glutathione transferase. La GST-g es importante para detoxificar toxinas celulares, es decir, ayuda a la célula a eliminar sustancias tóxicas, entre ellas el cisplatino, uno de los quimioterápicos más utilizados en



tratamiento de neoplasias de cabeza y cuello. Cuando el gen se encuentra amplificado, la célula se torna resistente al tratamiento con este fármaco, y así determina que el paciente tenga menor respuesta a este fármaco<sup>100,107</sup>.

## Virus

Las células tumorales de pacientes con carcinoma nasofaríngeo contienen el *virus de Epstein-Barr (VEB)* en más de un 90% de los casos. En esta enfermedad se ven títulos elevados de anticuerpos IgA e IgG, frente al antígeno de la cápside viral (VCA) y frente al antígeno temprano (EA), así como frente a la DNA-asa específica del VEB. Estos títulos elevados de anticuerpos pueden servir para el diagnóstico precoz en aquellas zonas con una alta incidencia de este tumor<sup>108</sup>. Además, la presencia del virus de Epstein-Barr se sabe que tiene valor pronóstico; puede actuar por inducción de mutaciones llevando a la formación de oncogenes, o alterando los genes supresores. Paralelamente puede disminuir la capacidad del sistema inmune para reconocer el tumor.

El *virus del papiloma humano (VPH)* está relacionado con el carcinoma escamoso de cavidad oral. Los tipos 16 y 18 pueden contribuir "in vivo" a la transformación maligna de los queratinocitos. El genoma del virus forma pequeños círculos de DNA, pero no está integrado en el genoma celular y puede diluirse después de una rápida división celular.

Los virus 16 y 18 producen dos proteínas, E6 y E7, que son necesarias para aumentar la capacidad proliferativa de los queratinocitos y, por tanto, pueden favorecer el desarrollo del tumor. Estas proteínas E6 y E7 se unen a las proteínas de los genes de supresión tumoral p53 y RB, respectivamente, degradando el gen p53. La capacidad de E7 de unirse a RB-1 se correlaciona con la capacidad del virus de promover el desarrollo tumoral de forma experimental; se puede perder la función del gen supresor.

El papel del VPH en el cáncer de cavidad oral no está totalmente clarificado, ya que las personas normales pueden tener este virus en la mucosa oral sin desarrollar el tumor, y no todos los pacientes con cáncer oral lo tienen.

No se han encontrado diferencias clínicas ni pronósticas significativas entre pacientes con cáncer oral con el VPH o sin él. Además, la presencia de este virus no se ha conseguido relacionar con el estadio T o N, la progresión local, frecuencia de metástasis o pronóstico del paciente<sup>109,110</sup>.

## **Defectos en proteínas**

### **1. Proteína p53.**

La proteína p53 está sintetizada por un oncogén recesivo situado en el cromosoma 17. El término "recesivo" indica que la proteína normal protege contra la aparición de tumores. La proteína p53 normal está involucrada en el control del ciclo celular, la reparación y síntesis del ADN, la diferenciación celular, la plasticidad del genoma y la muerte celular programada (apoptosis). Todas estas funciones no se desempeñan simultáneamente, sino que dependen de la interacción o la modificación concreta que la proteína sufra en diversas circunstancias. La función que más interesa en el campo de la oncogénesis es la de reparación y síntesis del ADN, que parece que ejerce un control para evitar la aparición de mutaciones.

En algunos tumores el gen de esta proteína ha desaparecido, pero lo más frecuente es que mute, de modo que la proteína se sobreexpresa (superproducción) o dura más de lo habitual. Hay un elevado número de mutaciones detectadas, cada una de las cuales puede afectar el funcionamiento de la proteína de una manera particular. En la mayoría de las células tumorales, la p53 está inactivada por mutación, mientras que en otras su función está bloqueada por otras vías. Sea cual sea el mecanismo, la proteína transformada no desempeña su papel habitual y ello incrementa la mutabilidad de la célula<sup>111</sup>.

Las alteraciones en este gen son extremadamente frecuentes y se han observado hasta en un 50% de todos los tumores humanos. En algunos casos, como los carcinomas de mama, el trastorno posee un valor pronóstico adverso. Sin embargo, en los carcinomas de cabeza y cuello no parece tener relación con las variables pronósticas (estadio, diferenciación, grado de infiltración, posibilidad de recidiva). Aproximadamente el 70% de los carcinomas de cabeza



y cuello presentan alguna mutación de la proteína y ésta aparece sólo en los tumores de fumadores <sup>69,104,112,113</sup>. Se postula que el benzopireno, un carcinógeno contenido en el tabaco, produce una mutación de guanina a citosina en el gen. De este modo, se trataría de una alteración precoz en la carcinogénesis de estas neoplasias y, si bien carece de significado pronóstico, tendría interés para el diagnóstico precoz.

Restaurar la función de la proteína p53 en las células tumorales es el sueño de muchos investigadores. Parece que la molécula activa de la p53 puede salvar vidas en ratas con cáncer metastásico agresivo. Hace nueve años, los estudios bioquímicos de la proteína p53 mostraron que su actividad in vitro como proteína de enlace al ADN podía estimularse al añadirle pequeños péptidos derivados del terminal C de la propia proteína. A pesar de que el mecanismo exacto sigue siendo debatido, la capacidad de los péptidos para activar algunas de las proteínas p53 mutantes del tipo hallado en tumores humanos animó a los investigadores a elaborar una forma de probar los péptidos in vivo. Para ello tuvieron que superar tres principales obstáculos: la fácil degradación de los péptidos por proteínas ubicuas, la baja tolerancia celular de los péptidos y la escasa potencia de los activadores péptidos. La superación de estos tres obstáculos ha sido costosa, y en la práctica requiere considerable gasto. Según David Lane, del Departamento de Cirugía y Oncología Molecular de la Universidad de Dundee (Reino Unido), "tal vez el mayor efecto de este estudio será su establecimiento como estrategia. Si el trabajo se reproduce, la reactivación de la proteína p53 mutante se aceptará como una perspectiva que puede curar cánceres metastáticos. Tal progreso favorecerá mayores inversiones necesarias para apoyar los ensayos clínicos."

Además de su involucración en el desarrollo de tumores, se ha encontrado relación entre la proteína p53 y el envejecimiento: su inhibición facilita el desarrollo cancerígeno, en tanto que su hiperactividad puede acelerar el proceso de envejecimiento.



## 2. Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

El receptor de esta sustancia (EGFR) está producido por un oncogen (por un protooncogen, si hablamos de células normales). Se ha prestado bastante atención al mismo porque el EGFR controla, en parte, el crecimiento de las células epidérmicas y, por ello, la mutación de su receptor podría dar lugar a un crecimiento incontrolado de los epitelios. Es más, la expresión del EGFR está aumentada en la mayoría de los tumores de cabeza y cuello<sup>104</sup>. Sin embargo, los estudios al respecto no han ofrecido resultados concluyentes y no parece que esta alteración se relacione con la extensión de la enfermedad (un dato de la capacidad de invasión) ni con la supervivencia global.

## 3. Citocromo p450.

El citocromo p450 es un sistema enzimático encargado de la metabolización de diversas sustancias tóxicas, entre ellas algunos carcinógenos. Está compuesto por un buen número de enzimas, que varían de un tejido a otro, e incluso de un individuo a otro para un mismo tejido. Se ha estudiado el posible papel que las variaciones en estas enzimas pueden jugar en la predisposición de un individuo al cáncer. Hasta ahora, los resultados no han sido convincentes, pero una enzima relacionada con el citocromo p450, la aril-hidroxilasa, parece ser defectuosa en los pacientes con tumores del área de cabeza y cuello, lo cual supondría un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad oncológica a este nivel<sup>100</sup>.

## 4. Proteínas del estroma celular.

Cada vez se presta mayor atención al tejido sobre el que asienta el tumor, y que puede verse afectado por éste y, al mismo tiempo, contribuir a su crecimiento o destrucción. Existe una serie de sustancias involucradas en la adhesión celular, y producidas por los fibroblastos y las células endoteliales. Entre ellas destacan las adherinas, dependientes del calcio, aunque también se han estudiado otras independientes del calcio, como las integrinas y selectinas. Cuando su producción disminuye, las células tumorales encuentran camino libre

para invadir los tejidos cercanos y, así, se ha comprobado que los tumores pobres en adherina son más indiferenciados y producen metástasis ganglionares con más frecuencia que los que no presentan este defecto<sup>114</sup>.

### **Papel de las células "normales" del estroma tumoral**

En los últimos años hemos asistido a un interés creciente por el estudio del estroma tumoral, en el que, además de células neoplásicas, existen otras células que pueden interaccionar con las primeras. Se trata de integrantes del sistema inmunológico, como los eosinófilos y los linfocitos.

#### **1. Eosinófilos.**

En las muestras histológicas de carcinomas de cabeza y cuello se observa un número variable de eosinófilos que rodean a las células tumorales. Su significado se puede interpretar de dos modos opuestos: quizá intervengan favoreciendo el crecimiento neoplásico, o quizá supongan una reacción del sistema inmune para rechazar y destruir tal crecimiento. Actualmente predomina esta segunda interpretación, de modo que se considera un dato de pronóstico favorable la presencia de numerosos eosinófilos en la pieza, y viceversa<sup>100,115</sup>.

#### **2. Linfocitos.**

Al hablar de linfocitos nos referimos principalmente a los "asesinos" o células NK. Tengamos en cuenta que el sistema de vigilancia inmunológica antitumoral se basa en dos pilares: el reconocimiento por los macrófagos de antígenos tumorales relacionados con el sistema HLA y la actividad de los NK. Las neoplasias indiferenciadas o pobremente diferenciadas no suelen mostrar antígenos HLA, con lo que, si además fallan los NK, el sistema inmune queda sin opciones para enfrentarse al crecimiento del tumor. Está bien establecido que los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello presentan un defecto inmunitario relacionado con los NK. Su función se encuentra disminuída en los ganglios, tanto si están infiltrados por la enfermedad como si no, de modo que



no responden a las citoquinas que los suelen activar (interleuquina 2, factor alfa de necrosis tumoral, interferón gamma). Se supone que las células tumorales producen algún tipo de sustancia inhibidora de la formación de dichas citoquinas; entre tales inhibidores pueden figurar las prostaglandinas y el factor de crecimiento de transformación beta. De cualquier modo, cuando la actividad de los linfocitos NK está disminuída, y en particular en tumores pobremente diferenciados, la supervivencia libre de enfermedad es más corta y la aparición de metástasis más probable<sup>115</sup>.

### Otros factores

Se ha estudiado la posible implicación pronóstica de algunas sustancias que pueden utilizarse como marcadores sanguíneos de un tumor: CEA, CA 19-9, antígeno asociado a células escamosas (SCC) y timidín-quinasa<sup>116,117</sup>. La timidín-quinasa es una enzima implicada en la síntesis de ADN y que, por ello, refleja la tasa de proliferación celular. Sin embargo, ninguno de estos posibles marcadores posee relación con el estadio clínico ni con la respuesta al tratamiento. En un estudio de Fontana et al<sup>117</sup>, la timidín-quinasa, junto con la velocidad de sedimentación, resultó un factor pronóstico, pero sus valores en sangre son difíciles de interpretar, ya que se elevan cuando hay un déficit de vitamina B<sub>12</sub> (frecuente en los alcohólicos, que suponen una proporción importante de los pacientes oncológicos de cabeza y cuello).

### 1.3.2. Histología

El carcinoma epidermoide puede existir en diversas formas, como carcinoma verrucoso, convencional y de células espinosas. Cada uno de ellos tiene características clínico-patológicas propias, con grados variables de malignidad, y variable respuesta a diferentes tratamientos.

A pesar de que la terminología aceptada en los últimos años es la de carcinoma escamoso o epidermoide, se encuentran descripciones en las que se



denomina epiteloma espinocelular, epiteloma de células escamosas, y epiteloma de globos córneos.

La microscopía óptica demuestra una serie de lesiones que pueden no ser muy homogéneas; por tanto, cabe la posibilidad de agrupamiento según la clasificación en grados realizada por Broders, o también la de carcinoma bien, moderadamente o poco diferenciado, o carcinoma indiferenciado. En otros casos, la definición celular es menos característica, pudiendo encontrarse zonas de transición con aspecto mesenquimatoso, carcinoma transicional y carcinoma linfoepiteliomatoso. Básicamente, se objetiva un acúmulo homogéneo de células epiteliales con un pequeño número de globos córneos, así como abundancia de células queratinizadas. El citoplasma suele estar poco diferenciado, por lo que existe una mayor apetencia por la hematoxilina. Los núcleos son relativamente mayores de lo normal e hipercrómicos, y se pueden observar unos nucleolos también mayores de lo normal. Desde luego, la presencia de mitosis anormal es constante.

La capa basal del epitelio está rota, apareciendo acúmulos de células epiteliales dentro de la submucosa. El tejido conjuntivo aparece casi siempre infiltrado por acúmulos de células plasmáticas, linfocitos y, en menor cantidad, neutrófilos.

La microscopía electrónica muestra la desaparición de la lámina basal que separa las células epiteliales del tejido conectivo.

Los procesos pseudopódicos citoplasmáticos suelen estar ausentes, mientras que se observan microfilamentos citoplasmáticos en zonas periféricas. También se observan cuerpos lisosomales anchos y numerosos, lo mismo que el aumento de mitocondrias, que son de tamaño menor del normal. Se observan con frecuencia diferentes grupos de vesículas en el aparato de Golgi, mientras que los centriolos y los microtúbulos son difíciles de encontrar, lo mismo que sucede con partículas de glucógeno y de restos lipoides. El núcleo celular es discretamente mayor de lo normal y de aspecto ovoide, y la cromatina aparece dispersa, aunque existan zonas pequeñas de acúmulos de

cromatina condensada. También se ve una gran cantidad de gránulos intercromatínicos y pericromatínicos.

### **Carcinoma verrucoso**

Descrito por Lauren Ackerman<sup>118</sup> en 1948 constituye una variante clínico-patológica del carcinoma epidermoide, de menor agresividad que éste. Es una entidad poco frecuente, cuyas diferencias en las características morfológicas y en la evolución clínica con el carcinoma escamoso permiten considerarlo como una entidad independiente.

Clínicamente se caracteriza por una tumoración blanquecina exofítica de lento crecimiento, con aspecto verrugoso. Se extiende lentamente a zonas vecinas, y su evolución habitual es una lesión localmente invasiva con mínima o ninguna displasia histológica. Biológicamente, la incidencia de metástasis es bajísima, de hecho su capacidad metastásica a distancia debe considerarse excepcional. Incluso tumores grandes, de años de evolución, que tienen la posibilidad de destruir hueso en su crecimiento, presentan escasa tendencia a diseminación metastásica. Además de la cavidad oral y orofaringe, es típica su presencia en la piel, genitales y en la planta de los pies.

El estudio histológico demuestra la presencia de células muy maduras y diferenciadas. Las células epiteliales están queratinizadas, la capa basal no suele estar rota, y la presencia de algún globo córneo es frecuente. Existe una intensa infiltración linfoplasmocitaria de tejido conjuntivo, así como la posibilidad de colonización de micelios entre las papilas periféricas de la tumoración. La conveniencia de realizar biopsia en el borde de la tumoración está aquí todavía más indicada que en otros casos.

La evolución de este tumor, después de su extirpación, es altamente positiva. La cirugía debe ser suficientemente amplia, puesto que la extirpación debe considerarse el tratamiento último de este proceso, y sería imperdonable la recidiva por una extirpación incompleta.



### **Carcinoma "in situ"**

Recibe también la denominación de carcinoma intraepitelial, puesto que afecta exclusivamente al epitelio de la mucosa.

La clínica suele acompañarse de una formación blanquecina, o bien eritematosa, pero siempre pequeña y con zonas de discreta erosión.

El momento clínico del paso de la lesión precancerosa a auténtico cáncer y la identificación del carcinoma in situ durante su silencio clínico plantean dos importantes problemas diagnósticos. Un alto número de estas tumoraciones se diagnostican en zonas de excisión de una lesión de leucoplasia ulcerada.

La anatomía patológica demuestra la posibilidad de encontrar un auténtico nudo neoplásico similar al del carcinoma epidermoide o de células escamosas, aunque sin sobrepasar los límites del epitelio. Por el contrario, hay casos en los que la evidencia de atipias no es tan clara. No obstante, en todos ellos se encuentra una displasia epitelial manifiesta.

La terapéutica consiste en la extirpación quirúrgica con márgenes de seguridad.

### **1.3.3. Estado actual del tema**

#### **Marcadores inmunológicos**

Se está realizando un gran esfuerzo para desarrollar marcadores en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, que se asocien al pronóstico tumoral.

#### **Antígenos de membrana**

El antígeno A9 se localiza en la membrana basal del epitelio escamoso estratificado, y se ve en los distintos tumores epidermoides con más intensidad que en las células normales. Es una estructura compleja que forma parte de la integrina y de los receptores de la matriz extracelular. La expresión de este antígeno aumenta con la progresión tumoral, se relaciona con la recidiva



temprana y con la mayor supervivencia, y es por tanto, un marcador de la agresividad tumoral.

Los antígenos ABH de grupos sanguíneos se encuentran en varios tipos de células epiteliales. En tumores de cabeza y cuello se ha visto pérdida de la expresión de estos antígenos. Esto ha sido relacionado por algunos autores con la capacidad de invasión local y metastásica del tumor, con la recidiva temprana y con la menor supervivencia<sup>119</sup>.

Algunos autores<sup>114,120</sup> han determinado la expresión de la cadherina E como marcador del potencial metastásico de los tumores de cabeza y cuello. Los estudios "in vitro" han demostrado que la pérdida de esta molécula de adhesión intercelular lleva a la desaparición de las características de las células epiteliales, llevando a las células a una apariencia de fibroblastos con una mayor capacidad para invadir tejidos adyacentes. En un estudio de Schipper et al<sup>114</sup> se ha determinado la expresión de la cadherina E en 32 carcinomas de cabeza y cuello. Se vio la relación de la cadherina E con el grado de diferenciación; los niveles más elevados se ven en pacientes con tumores bien diferenciados. A medida que el tumor se va haciendo más indiferenciado, va disminuyendo la cantidad de esta molécula, y va incrementándose el potencial metastásico del tumor.

### Inmunocomplejos circulantes

En pacientes con cáncer de cabeza y cuello se han detectado niveles elevados de inmunocomplejos circulantes.

Algunos autores como Denaro et al miden los inmunocomplejos circulantes y ven su relación con el comportamiento tumoral; suelen disminuir después de la intervención quirúrgica en la mayoría de los pacientes, permaneciendo elevados en aquellos que van a desarrollar una recurrencia de la enfermedad<sup>121</sup>. Schantz et al determinan los niveles séricos de macromoléculas unidas a C1q (C1qBM), encontrando niveles elevados en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello. Aquellos pacientes que no

responden a la quimioterapia de inducción tienen niveles significativamente superiores en comparación con aquellos que responden<sup>122</sup>.

### Marcadores serológicos

Aunque el antígeno carcinoembrionario (CEA) está elevado con frecuencia en tumores del tracto aerodigestivo superior, y algunos autores encuentran correlación entre los niveles de CEA y el estadio de la enfermedad, la sensibilidad de este marcador es baja. Algunos estudios muestran tan solo una sensibilidad del 30% en pacientes con tumores cérvicofaciales en estadios III y IV<sup>123</sup>.

La determinación de LASA (lípidido asociado al ácido siálico) en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello ha demostrado su relación con la masa tumoral, y se correlaciona significativamente con el estadio de la lesión primaria, existencia de metástasis a distancia y el estadio global. Puede tener valor a largo plazo en el seguimiento de aquellos pacientes con riesgo de recurrencia<sup>123</sup>.

El antígeno de células escamosas (SCC-Ag) está elevado en un 40% de pacientes con cáncer de cabeza y cuello avanzado y no tratado. Los pacientes con metástasis a distancia suelen tener valores más elevados que aquellos sin metástasis. Con la excepción de la enfermedad en estadio M1, el SCC-Ag no parece ser superior al CEA. Además, aunque la especificidad del SCC-Ag es mayor que la del LASA, tiene menos sensibilidad<sup>123</sup>.

Los niveles de LDH están elevados en pacientes con enfermedad locorregional extensa y con enfermedad metastásica. Por tanto, aunque no son específicos, pueden tener valor para sugerir la existencia de metástasis a distancia<sup>123</sup>.

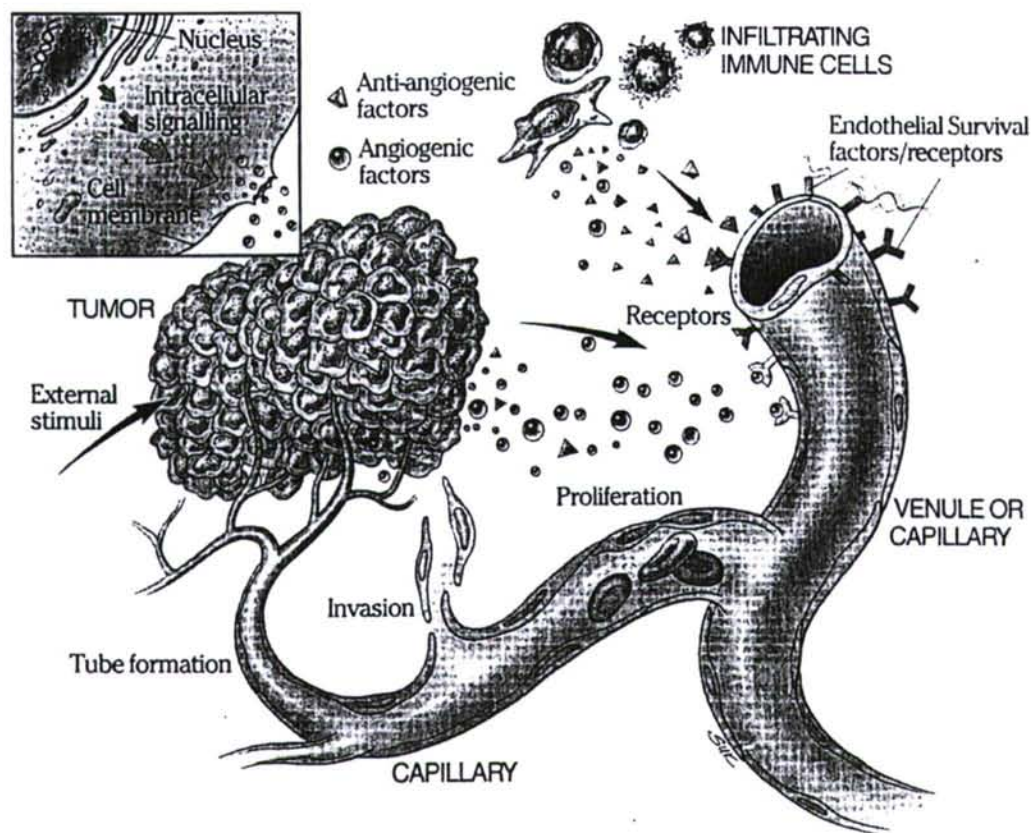
## 1.4. ANGIOGENESIS

### 1.4.1. Introducción

Un paso crucial para el progresivo crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis es la inducción de vascularización, proceso conocido como *angiogénesis*<sup>124-126</sup>. Una masa tumoral que es menor de 0.5 mm de diámetro puede recibir oxígeno y nutrientes por difusión, pero cualquier incremento de la masa tumoral más allá de los 0.5 mm requiere la proliferación y morfogénesis de células endoteliales vasculares<sup>126,127</sup>, para aporte vascular, y como tal de nutrientes, que permita a las células tumorales perpetuar sus procesos de proliferación, multiplicación, migración, e invasión de estructuras adyacentes.

El proceso de la angiogénesis consiste en una serie de pasos secuenciales e interdependientes. Se inicia con la degradación local de la membrana basal de los capilares vecinos, que se continúa con la invasión del estroma periférico por las células endoteliales subyacentes en la dirección del estímulo angiogénico. La migración de células endoteliales se acompaña de la proliferación de nuevas células endoteliales y su organización en una estructura tridimensional que se une a otras estructuras similares para formar una red de nuevos vasos sanguíneos<sup>128</sup>.

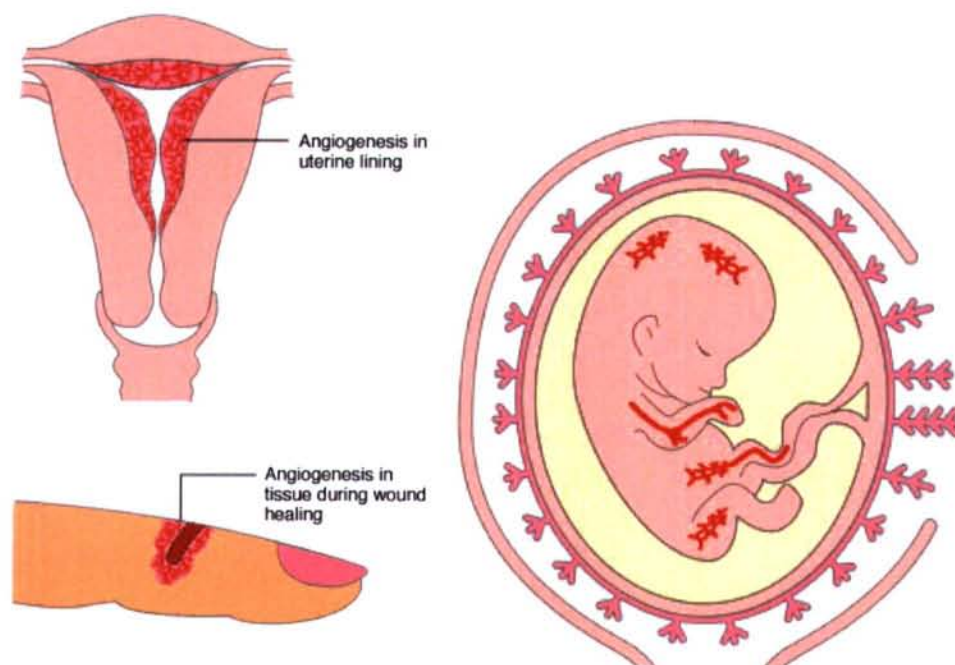




**Figura 18.** El proceso angiogénico. El proceso de la angiogénesis es una serie de pasos encadenados y secuenciales que se dirigen en última instancia al desarrollo de un neovascular a la masa tumoral. Diferentes pasos del proceso angiogénico pueden estar aconteciendo al mismo tiempo en diferentes partes de la masa tumoral. Las células tumorales, o las células huésped (células inmunes infiltrantes o tejido normal adyacente), secretan factores de crecimiento angiogénico (angiogenic growth factors), que se unen a receptores específicos en las células endoteliales. Esta interacción ligando-receptor determina en las células endoteliales procesos de proliferación, migración, invasión y, eventualmente, formación de estructuras tubulares del tipo de capilares. Determinados factores también afectan a la supervivencia de las células endoteliales ante condiciones adversas, como ocurre en el caso de tumores. El proceso proangiogénico está regulado por la actividad de moléculas con acción antiangiogénica, de forma similar a lo que ocurre en cualquier mecanismo homeostático. Cuando la actividad de las moléculas proangiogénicas supera la actividad de las moléculas antiangiogénicas se produce la formación de nuevos vasos sanguíneos. Los factores proangiogénicos se pueden expresar constitutivamente, pero su expresión se puede ver incrementada por ciertos estímulos, como la hipoxia, un pH ácido, citokinas, factores de crecimiento, el tamaño tumoral, oncogenes activados, mecanismos de transducción de señales, o pérdida de la función de los genes supresores tumorales.

Pero el proceso angiogénico es un mecanismo que no sólo ocurre en situaciones patológicas como el crecimiento tumoral, sino que también es un proceso fisiológico en tejidos normales. La formación de nuevos vasos

sanguíneos acontece en los cambios cíclicos del endometrio uterino, en los procesos inflamatorios y de cicatrización de heridas, o en situaciones patológicas como la retinopatía diabética o la artritis reumatoide.



**Figura 19.** Diferentes procesos fisiológicos en que se ven implicados mecaismos angiogénicos.

De hecho la angiogénesis tiene lugar de forma reglada durante el desarrollo embrionario, y también está implicada en procesos como la cicatrización tisular y en procesos relacionados con funciones reproductoras en el adulto.





**Figura 20.** Proceso de cicatrización de una herida con pérdida de sustancia. Imágenes de la fase de cicatrización a las 24 horas (superior izquierda), 3 días (superior derecha), 7 días (inferior izquierda), y 1 mes (inferior derecha).

Además está implicada en el establecimiento y progresión de diversas situaciones fisiopatológicas no neoplásicas. Así, desempeña un papel clave en la patogénesis de la retinopatía diabética y la fibroplasia retrolental, o en enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide.

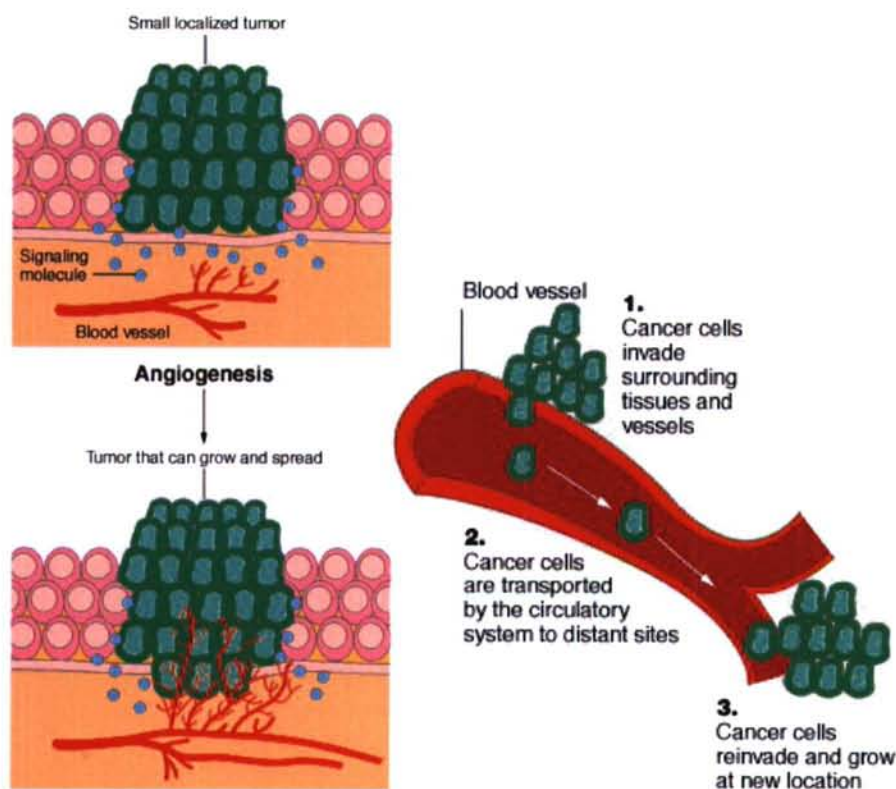
Esto ha dado lugar al desarrollo de diferentes líneas de investigación asociadas directa o indirectamente al fenómeno de la angiogénesis. Incluso muchas de ellas han desembocado en ensayos clínicos en diferentes fases, y han conducido a aplicaciones terapéuticas diversas en la práctica clínica cotidiana. De hecho, existen numerosos fármacos ya comercializados con propiedades antiangiogénicas que permiten tratamientos de diversas enfermedades. Así, fármacos antiangiogénicos como el pegaptanib y el ranibizumab han demostrado su eficacia en enfermedades oftálmicas como la degeneración macular asociada a la edad<sup>129,130</sup>. En Oncología se han empezado a emplear recientemente fármacos con actividad antiangiogénica como erlotinib o docetaxel.



### 1.4.2. Evolución histórica

El término “angiogénesis” fue acuñado en 1935 para describir la formación de nuevos vasos sanguíneos en la placenta<sup>131</sup>. La implantación de una cámara transparente en la oreja de un conejo hizo posible la observación del fenómeno de la angiogénesis en la cicatrización de una herida<sup>132-134</sup>. En experimentos posteriores, se insertaron tumores en cámara anterior del ojo de ratones y se observó la presencia de vasos sanguíneos tumorales<sup>135-137</sup>. Durante dos décadas se asistió a una enorme controversia sobre si los tumores recibían nutrición procedente de vasos preexistentes o de neovasos. Entre los que defendían la hipótesis de la neovascularización, algunos sugerían que las mismas células tumorales en fase proliferativa eran las que inducían la formación de nuevos capilares sanguíneos<sup>138-140</sup>. Otros autores pensaban que la neovascularización de los tumores era simplemente una reacción inflamatoria. Incluso algunos llegaban a considerar que los tumores podían desarrollar sus propios canales vasculares tapizados por propias células tumorales. De todas formas, existían mínimos indicios científicos que sugirieran que el crecimiento tumoral era dependiente de un crecimiento vascular.

La angiogénesis comprende una serie de procesos regulados en los que participan fundamentalmente las células endoteliales. Después de su activación por los estímulos proangiogénicos, las células son capaces de degradar la matriz extracelular, migrar hacia los tejidos circundantes, proliferar y ensamblarse para formar nuevos vasos sanguíneos, que posteriormente experimentarán procesos de remodelación y estabilización mediante el reclutamiento de células perivasculares. Estos mecanismos también acontecen en los tejidos peritumorales, creando de esta forma las condiciones adecuadas para la proliferación y diseminación tumoral.

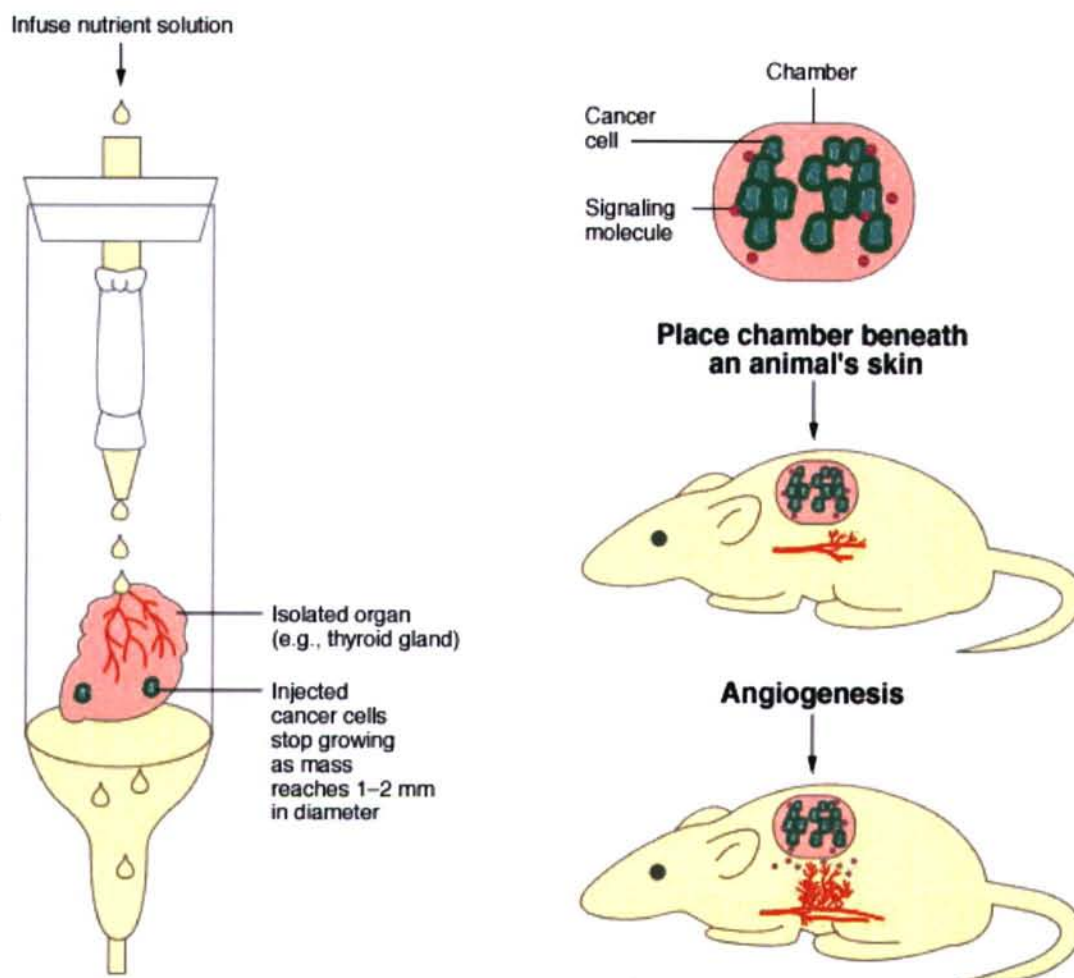


**Figura 21.** Procesos angiogénicos en los tejidos peritumorales que favorecen el crecimiento de la masa tumoral (imagen izquierda). Diseminación tumoral a través de vasos sanguíneos (imagen derecha).

### Hipótesis de que los tumores son angiogénesis-dependientes

En estudios experimentales iniciados en 1963 por Folkman et al se encontró que tumores implantados en órganos perfundidos aislados dejaban de crecer más allá de unos pocos milímetros de diámetro<sup>139-141</sup>. Sin embargo, si esos tumores se implantaban en un ratón, crecían rápidamente más allá de 1 cm<sup>3</sup>, e incluso mataban al huésped. En los ratones, los tumores se vascularizaban, mientras que en órganos aislados no. Estas observaciones resultaron escasamente relevantes en un principio, hasta que se descubrió que el endotelio de los capilares sanguíneos en esos órganos sufría una degeneración gradual por la perfusión continua<sup>142,143</sup>. Estos órganos aislados y perfundidos proporcionaban las condiciones adecuadas para un fracaso en el proceso de neovascularización que limitaba el crecimiento tumoral.





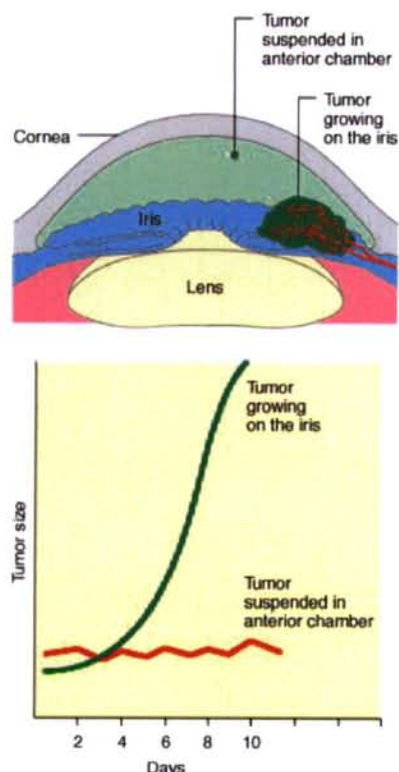
**Figura 22.** Estudios experimentales de Folkman que encontraron que tumores implantados en órganos perfundidos aislados dejaban de crecer más allá de unos pocos milímetros de diámetro (imagen izquierda). Sin embargo, si esos tumores se implantaban en un ratón, crecían rápidamente más allá de 1 cm<sup>3</sup>, e incluso mataban al huésped.

En base a estos estudios se formuló la hipótesis de que “los tumores sólidos son angiogénesis-dependientes”, y que los mecanismos de “antiangiogénesis” podrían desempeñar un papel terapéutico potencialmente importante<sup>142,143</sup>. En terminología simple, esta hipótesis se podría resumir en: “Una vez que el tumor se ha desarrollado, cada incremento de la población celular tumoral debe ir precedido por la formación de nuevos capilares sanguíneos que nutran ese tumor”.



Posteriormente esta idea fue moldeándose merced a nuevos estudios experimentales. Gimbrone et al<sup>144</sup> separaron células tumorales del lecho vascular para evitar su neovascularización. Esos tumores dejaron de crecer a un pequeño tamaño de tan solo 1 a 2 mm<sup>3</sup>, pero conseguían un crecimiento rápido cuando recibían aporte vascular. Incluso se obtuvieron modelos in vitro en los que existía un estado prevascular, dando lugar a lo que se consideró como "tumores durmientes"<sup>145</sup>. El estudio histológico de éstos, con especial énfasis en la tinción de los capilares, reforzó nuevamente la idea de que el crecimiento tumoral está asociado a la proliferación capilar<sup>146,147</sup>. Más aún, se observó que las células tumorales rodeaban a los capilares sanguíneos a modo de cilindro con un radio de 150 a 200 µm, equivalente a la distancia de difusión del oxígeno. Los fenómenos de síntesis de DNA iban disminuyendo a medida que las células tumorales se alejaban del capilar sanguíneo.

De hecho, se observó que tumores suspendidos en cámara anterior del globo ocular, en condiciones avasculares, no crecían. Por el contrario, esas mismas implantaciones tumorales en el iris ocular, con capacidad de desarrollar neovasos, experimentaban crecimiento y progresión tumoral<sup>145</sup>.



**Figura 23.** Estudios experimentales que demostraron la ausencia de proliferación tumoral en áreas con mínima capacidad neoangiogénica, en comparación con la rápida proliferación tumoral en tejidos con capacidad de formación neovascular.

### Aislamiento de un factor angiogénico en los tumores

Dos estudios experimentales de 1968 demostraron que los tumores podían inducir la génesis de nuevos capilares sanguíneos a pesar de la separación de las células tumorales del lecho vascular del huésped<sup>148,149</sup>. Con ello se establecía la presunción de evidencia de que existía la liberación y difusión de un factor angiogénico derivado del tumor. Sin embargo, no se podía excluir una explicación alternativa: la degradación de un factor inhibidor de la angiogénesis por el propio tumor.

La primera publicación sobre el aislamiento de un factor angiogénico producido por un tumor fue a principios de la década de los 70<sup>150,151</sup>, y a partir de un medio condicionado de células transformadas en 1976<sup>152</sup>. Posteriormente aparecieron otras publicaciones sobre factores angiogénicos derivados de

células tumorales<sup>153-155</sup>. Sin embargo, el avance que supuso la aparición de estas nuevas moléculas se vio obstaculizado por la ausencia de bioensayos adecuados, así como por el escaso conocimiento que se tenía sobre las diferentes fases del proceso angiogénico.

## **Desarrollo de nuevos métodos para el estudio de la angiogénesis**

El mecanismo de la angiogénesis ha sido considerado clásicamente como un fenómeno inaccesible a las técnicas experimentales convencionales. Cuatro nuevos métodos para su estudio fueron desarrollados en la década de los 70s:

- El desarrollo de un microbolsillo corneal permitió la medida lineal de capilares individuales a medida que éstos crecían hacia un tumor o hacia una sustancia angiogénica implantada en la córnea de un conejo<sup>156</sup>, de un ratón<sup>157</sup> o de una rata.
- Se desarrollaron polímeros biocompatibles para la liberación continuada de factores angiogénicos in vivo<sup>158</sup>.
- La membrana corioalantoica del embrión de pollo se usó para establecer la actividad angiogénica de fracciones parcialmente purificadas de la masa tumoral<sup>152,159</sup>.
- Se cultivaron células endoteliales vasculares a partir de la aorta<sup>160</sup>, de estructuras venosas<sup>161</sup> y de capilares<sup>162</sup>, y se utilizaron para la obtención de factores de crecimiento celular endotelial.

## **Los componentes de la angiogénesis**

Los métodos descritos se comenzaron a emplear para profundizar en los conocimientos sobre los acontecimientos secuenciales que tienen lugar en la proliferación de capilares in vivo. Así se descubrió que los neocapilares se originan principalmente a partir de brotes de vénulas próximas<sup>163</sup>. La degradación local de la membrana basal de la pared de esas vénulas provoca una migración de células endoteliales guiadas por un estímulo angiogénico determinado. Estas células endoteliales se alinean entre ellas para configurar un



brote vascular sólido. En su interior se producen cambios en la configuración estructural que determinan la creación de una luz tubular<sup>163</sup>. La proliferación de nuevas células endoteliales incrementa la longitud del brote inicial. Dos brotes ahuecados se unen en sus extremos para formar un loop, a través del cual comienza a fluir la sangre. Los pericitos se posicionan a lo largo del loop inicial, y configuran nuevos brotes que continúan el proceso angiogénico. El conocimiento de los pasos en la proliferación capilar llevó al desarrollo de bioensayos in vitro, basados fundamentalmente en tres de estos componentes del proceso angiogénico: la degradación enzimática de la membrana basal<sup>164</sup>, la migración de las células endoteliales<sup>165,166</sup>, y la proliferación de las células endoteliales<sup>160,162</sup>.

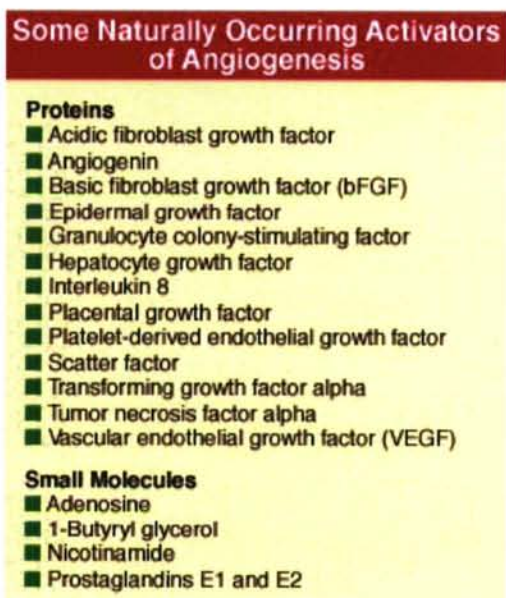
### 1.4.3. Angiogénesis neoplásica

“Una masa tumoral que es menor de 0.5 mm de diámetro puede recibir oxígeno y nutrientes por difusión, pero cualquier incremento de la masa tumoral más allá de los 0.5 mm requiere la proliferación y morfogénesis de células endoteliales vasculares”. Estas palabras de Folkman constituyen la base de lo que se denomina angiogénesis neoplásica, un fenómeno determinante no solamente en el crecimiento de la masa tumoral sino también en el desarrollo de metástasis.

En los últimos años, los avances en el conocimiento de los mecanismos angiogénicos tumorales han sido muy importantes. Sin embargo, su aplicación clínica real para determinar el pronóstico del cáncer y el desarrollo de terapéuticas antiangiogénicas tumorales han sido muy escasos.

El establecimiento de fenómenos de angiogénesis conlleva una alteración en el equilibrio entre moléculas proangiogénicas y antiangiogénicas<sup>124-126,128,167</sup>. Estas moléculas pueden mediar múltiples pasos en el proceso de la angiogénesis, y también pueden condicionar la función de diversas estirpes celulares no involucradas en angiogénesis.

Un *factor angiogénico* es un factor que selectivamente altera las características de las células endoteliales y estructuras perivasculares asociadas (pericitos, células musculares lisas de las paredes vasculares, etc), pero no afecta la función de otros tipos celulares. En la figura 24 se describen los principales factores con actividad proangiogénica descritos hasta la actualidad.



**Figura 24.** Principales factores proangiogénicos descritos.

El *factor de crecimiento vascular endotelial* – *factor de permeabilidad vascular* (VEGF / VPF) se detectó inicialmente como un factor secretado por células en un medio de cultivo tisular o en líquido ascítico in vivo<sup>168</sup>. El factor fue identificado como una proteína ligada a heparina de peso molecular de 34 a 42 kilodaltons (kD), y fue denominada VPF (Vascular Permeability Factor). Posteriormente se demostró que ese factor VPF también estimula la división celular endotelial<sup>169</sup>. Al mismo tiempo, y de forma independiente, diferentes grupos aislaron una proteína que tenía actividad mitogénica selectiva en cultivos de células endoteliales, y la denominaron VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)<sup>170,171</sup>. En base al análisis de aminoácidos y la secuencia de DNA complementario, posteriormente se descubrió que el VEGF y el VPF son la misma proteína<sup>172</sup>, y el término con el que se le designa más comúnmente es VEGF, es decir, *factor de crecimiento vascular endotelial*.



El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es una glicoproteína ligada a heparina homodimérica que existe en al menos cuatro isoformas debido al empalme alternativo del RNA mensajero (mRNA) primario transcrito. Estas isoformas son designadas como VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, y VEGF<sub>205</sub>, de acuerdo al número de aminoácidos que contiene cada proteína<sup>172</sup>. La permeabilidad vascular inducida por el VEGF es 50.000 veces la inducida por la histamina, que se toma como medida estándar para cuantificar la inducción de permeabilidad<sup>173</sup>. Esta inducción de permeabilidad por VEGF permite la difusión de proteínas al tejido intersticial, donde migran las células endoteliales.

Los receptores para el VEGF se expresan casi exclusivamente en las células endoteliales. En raras ocasiones se ha demostrado la expresión de varios receptores de VEGF en células de origen neural, células de sarcoma de Kaposi, células hematopoyéticas precursoras, y en otras raras estirpes de células tumorales<sup>174,175</sup>. Se han podido identificar tres receptores de VEGF / VPF. El *receptor fms-like tirosina kinasa* (Flt-1) y el *receptor hepático fetal kinasa 1/ kinasa con dominio insertado* (Flk-1/KDR) son receptores de alta afinidad para el VEGF, con un dominio extracelular que contiene siete dominios inmunoglobulina-like y un dominio intracelular tirosina kinasa<sup>170</sup>. El Flk-1 tiene un 85% de homología con el homólogo humano, KDR. Ambos Flk-1 y Flk-1/KDR han demostrado ser importantes reguladores para la vasculogénesis y la angiogénesis fisiológica<sup>176</sup>. Sin embargo, la interacción del VEGF / VPF con el Flk-1/KDR se considera la interacción más importante para la angiogénesis tumoral, al ser esencial para la inducción del espectro completo de funciones del VEGF / VPF<sup>170</sup>. De hecho, numerosos compuestos y moléculas desarrolladas para bloquear las actividades del VEGF / VPF mediadas por Flk-1/KDR han demostrado tener actividad antiangiogénica en modelos animales<sup>176</sup>. Más recientemente, el *receptor VEGFR-3* (Flt-4) se ha mostrado como un receptor para el VEGF-C, probablemente el más involucrado en la angiogénesis linfática<sup>176</sup>.

Al menos se conocen cuatro nuevos miembros de la familia VEGF. El factor VEGF previamente mencionado se describe posteriormente como *VEGF-*



A. El *VEGF-B* tiene un papel importante probablemente en la vasculogénesis, pero puede también desempeñar otras funciones tales como activación de enzimas invasivos en las células endoteliales<sup>176,177</sup>. El *VEGF-C* se asocia frecuentemente con la angiogénesis linfática. Sin embargo, más recientemente se ha asociado su expresión con la angiogénesis tumoral a varios niveles<sup>178-181</sup>. El *VEGF-C* se une preferentemente al receptor VEGFR-3. Existen incluso estudios que relacionan su expresión con metástasis linfáticas<sup>182</sup>. El papel del *VEGF-D* está por ahora menos definido. Esta proteína puede ligarse a receptores VEGFR-2 y VEGFR-3, y parece que puede inducir angiogénesis in vivo<sup>183,184</sup>. Muy poco se conoce en el momento actual del *VEGF-E*, excepto que se une al receptor VEGFR-2 y que puede inducir mitosis de células endoteliales y, por tanto, fenómeno de angiogénesis<sup>185,186</sup>.

Recientemente se ha publicado un estudio del Centro de Investigación Biológica del Massachusetts General Hospital (Boston, USA)<sup>187</sup>, realizado en ratones transgénicos y normales a los que se les indujeron tumores cutáneos malignos, y que determina el papel de la proteína VEGF-A como promotora del desarrollo de vasos linfáticos que distribuyen las células tumorales hacia los ganglios linfáticos que sirven como vía de metástasis tumoral al inducir la formación de nuevos vasos linfáticos entre los ganglios, incluso después de que se haya desarrollado un tumor secundario. Este hallazgo constituye una vuelta de tuerca a la hipótesis que postula que los distintos tipos de tumores metastatizan preferentemente en los órganos que son especialmente óptimos para ellos, y que la proteína VEGF-A desempeñaría un papel crucial en el proceso de selección y preparación del camino para la metastatización del tumor.

Otra familia de moléculas específicas de las células endoteliales es la familia de las *angiopoyetinas* (*Ang*). Hasta el momento sus miembros son designados como angiopoyetinas 1 a 4. Las proteínas cuyas funciones son más caracterizadas son Ang-1 y Ang-2. Ambas proteínas se ligan a receptores tirosina-kinasa Tie-2 en las células endoteliales. Ang-1 actúa como agonista y se considera involucrada en la diferenciación y estabilización de las células

endoteliales<sup>188</sup>. Por el contrario, la Ang-2 se liga a receptores Tie-2 y bloquea la unión de la Ang-1 a dichos receptores. Este bloqueo produce desestabilización de las células endoteliales y regresión vascular<sup>189,190</sup>. Aunque en las células endoteliales también se han identificado receptores Tie-1, su estructura y su función permanecen como una incógnita por desvelar.

Numerosas moléculas angiogénicas inespecíficas afectan no sólo al crecimiento de células endoteliales, sino también al crecimiento de otras estirpes celulares. Entre estos factores están el *factor de crecimiento fibroblástico* (FGF), ácido y básico, el *factor de crecimiento transformante  $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ), el *factor de crecimiento epidérmico* (EGF), el *factor de crecimiento derivado de plaquetas* (PDGF), el *factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas* (PD-ECGF), la *angiogenina*, y las quimioquinas CXC *interleukina-8* (IL-8), *proteína inflamatoria de macrófagos 1* (MIP), *factor plaquetario 4* (PF-4), y el *oncogén relacionado con el crecimiento  $\alpha$*  (GRO- $\alpha$ )<sup>191</sup>. También se ha demostrado que el *factor de crecimiento transformante  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) activa la progresión tumoral de algunos cánceres en fases avanzadas<sup>192</sup>.

El proceso de la angiogénesis se caracteriza por ser un proceso complejo y dinámico. De hecho, el desarrollo de una neovascularización es un conjunto de procesos sucesivos encadenados que eventualmente conlleva la formación de nuevos vasos sanguíneos. Varios estudios han demostrado que diferentes operaciones en el proceso global de la angiogénesis pueden ser regulados por diferentes factores angiogénicos<sup>193</sup>. Por ejemplo, el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) es el inductor de mitosis de células endoteliales más potente, seguido por el VEGF y el PD-ECGF. Los factores VEGF y bFGF son también los factores de supervivencia de células endoteliales más potentes. Sin embargo, el bFGF es el factor angiogénico más asociado con la estimulación de la actividad de enzimas degradativos. El factor de crecimiento hepatocítico estimula la motilidad de las células endoteliales más que ningún otro factor estudiado. El reconocimiento más reciente de la Ang-1 y la Ang-2 y su papel en la estabilización de células endoteliales sugiere que estas moléculas también son fundamentales en la supervivencia de las células endoteliales<sup>190</sup>.



## Angiogénesis mediada por células linfoides

El proceso de angiogénesis es fundamental en el mecanismo de homeostasis, y su regulación por células linfoides como linfocitos T, macrófagos y células mastoides es bien conocida<sup>194-196</sup>. Una reacción inflamatoria local mediada por linfocitos T y macrófagos con frecuencia se encuentra asociada con melanoma cutáneo invasivo, y una reacción inflamatoria intensa con frecuencia se asocia a mayor riesgo de desarrollar metástasis. Ello sugiere que fenómenos de angiogénesis inducidos por procesos inflamatorios pueden contribuir a la progresión del melanoma y al desarrollo de metástasis<sup>196</sup>.

Los mecanismos inmunológicos involucrados en los procesos fisiológicos de angiogénesis son activados de manera encadenada durante la cicatrización de heridas<sup>195</sup>. Se ha demostrado que la utilización sistémica de determinados quimioterápicos produce un retardo del proceso fisiológico de la cicatrización, posiblemente a través de una disminución de la respuesta inmunológica. El papel que en ello tiene la inhibición de la angiogénesis no está claro actualmente<sup>197</sup>. Gutman et al<sup>196</sup>, en 1994, observaron que el crecimiento de melanoma B16 estaba retardado en ratones inmunosuprimidos. Otros estudios encontraron un retardo similar en el crecimiento tumoral en ratones tratados con quimioterápicos<sup>197</sup>. Estos hallazgos científicos parecen soportar el concepto de que el desarrollo tumoral puede obtener ventaja de determinados mecanismos homeostáticos.

Takahashi et al<sup>198</sup> han demostrado el papel de células infiltrantes en la angiogénesis del cáncer de colon en humanos. En su trabajo encuentran una gran expresión de factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF) en células infiltrantes, principalmente macrófagos y linfocitos, a pesar de que encuentran escasa expresión del PD-ECGF en las células epiteliales tumorales. La intensidad de la tinción para PD-ECGF en las células infiltrantes se correlacionaba con el conteo de vasos, lo que sugiere la implicación de estas células en la angiogénesis del cáncer de colon en humanos.

Desde hace años se considera que los macrófagos son importantes células efectoras en los mecanismos de angiogénesis<sup>194,195</sup>. Pueden estimular el

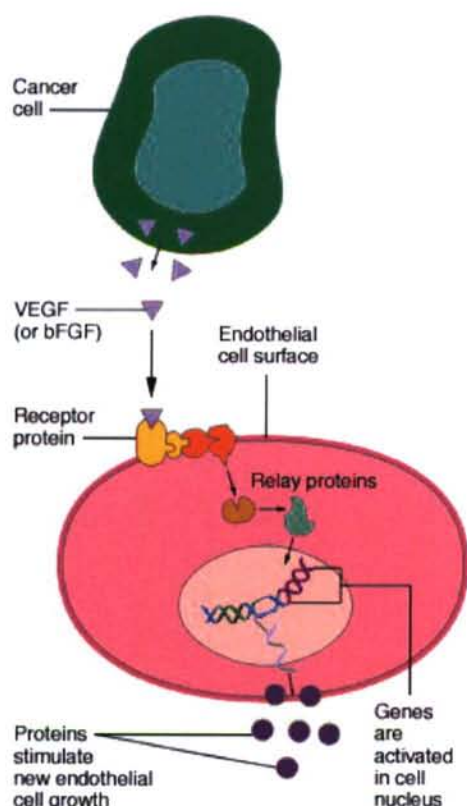


crecimiento de nuevos capilares a través de varios mecanismos. En primer lugar, producen factores que activan directamente las funciones asociadas a la angiogénesis de las células endoteliales. Estudios *in vitro* han demostrado que los macrófagos producen más de 20 moléculas que influyen la proliferación, migración y diferenciación *in vitro* de las células endoteliales<sup>194</sup> y que son potencialmente angiogénicas *in vivo*. Un segundo mecanismo por el que los macrófagos pueden modular la angiogénesis es mediante la modificación de la matriz extracelular. La composición de esta matriz extracelular se ve influenciada por la morfología de las células endoteliales, y se ha visto que pueden influir profundamente en el crecimiento de nuevos capilares<sup>199</sup>. Los macrófagos influyen en la composición de la matriz extracelular a través de la producción directa de determinados componentes o a través de la producción de proteasas, que a su vez alteran la composición y estructura de la matriz extracelular<sup>195</sup>. Un tercer mecanismo es mediante la producción de sustancias supresoras de la angiogénesis. Los macrófagos han demostrado expresar el inhibidor de la angiogénesis trombospondin-1 (TSP-1) al estar bajo la acción quimiopreventiva del ácido retinoico<sup>199-201</sup>.

### **Regulación de la expresión de factores angiogénicos en tumores**

Las células tumorales expresan factores angiogénicos, o pueden responder a estímulos externos. El estímulo externo más potente de expresión de factores angiogénicos es la hipoxia<sup>202-204</sup>. La situación de hipoxia es una consecuencia de un tejido que está pobremente perfundido, y por tanto simula idealmente la respuesta apropiada a la situación de las células intentando sobrevivir. La hipoxia incrementa típicamente la expresión de factores angiogénicos mediante la señal inductora de la puesta en marcha de los mecanismos en cascada que terminan en la transcripción de VEGF y la estabilización del mRNA transcrito. También estimula la expresión de otros factores angiogénicos como la angiogenina, el PD-ECGF y la interleukina-8<sup>205-207</sup>. Otros factores microambientales que incrementan la respuesta angiogénica

incluyen varias citoquinas y factores de crecimiento. Las citoquinas, factor de crecimiento de insulina-1, factor de crecimiento de insulina-2, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento hepatocítico, interleukina-1, y factor de crecimiento derivado de plaquetas, han demostrado ser activadores de la expresividad del VEGF<sup>208-210</sup>. Por lo tanto, la terapia antiangiogénica puede regular la inhibición de mecanismos anteriores en la cascada sobre los que actúan factores angiogénicos, más que actuar directamente sobre las moléculas<sup>211</sup>. Incluso otras proteínas producidas por genes supresores de tumores como el Von Hippel – Lindau, o el gen supresor p53, también se ha demostrado que actúan como reguladores de la angiogénesis<sup>204,212-217</sup>.



**Figura 25.** Angiogénesis neoplásica a través de factores proangiogénicos.

### Inhibidores endógenos de la angiogénesis

En la actualidad tenemos conocimiento de un gran número de proteínas endógenas que se comportan como inhibidores de la angiogénesis<sup>218</sup>. Entre ellas se encuentran el trombospondín-1 (TSP-1)<sup>219,220</sup>; los interferones IFN- $\alpha$ , - $\beta$



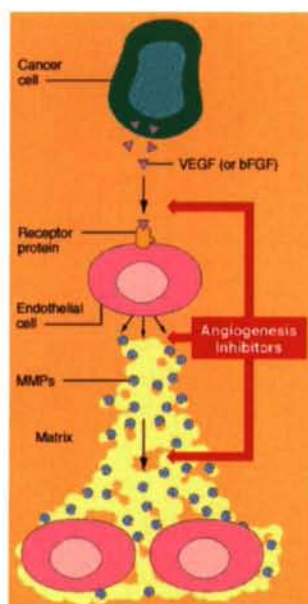
y  $\gamma$ <sup>221,222</sup>; el fragmento de prolactina de 16 kilodaltons<sup>223</sup>; la angiostatina<sup>224</sup>; la endostatina<sup>225</sup>; el inhibidor de VEGF<sup>226</sup>; la vasostatina<sup>227</sup>; el METH-1 y METH-2<sup>228</sup>; y productos de liberación del factor plaquetario-4<sup>229</sup> o de la antitrombina III<sup>230</sup>, entre muchos otros. Algunos de ellos son fragmentos internos de varias proteínas que normalmente carecen de actividad antiangiogénica alguna<sup>231</sup>; por ejemplo, el componente activo de la angiostatina comprende uno o más fragmentos del plasminógeno<sup>224</sup>, y la endostatina es un fragmento de colágeno tipo XVIII<sup>225</sup>.

Angiogenesis Inhibitors	
<b>Proteins</b>	
■	Angiostatin
■	Endostatin
■	Interferons
■	Platelet factor 4
■	Prolactin 16Kd fragment
■	Thrombospondin
■	TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1)
■	TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2)
■	TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3)

**Figura 26.** Factores endógenos inhibidores de angiogénesis.

En la actualidad se considera que el proceso de angiogénesis tumoral se desencadena como resultado de un desequilibrio en el balance entre moléculas estimuladoras e inhibidoras<sup>167</sup> (concepto de "switch angiogénico"). Cuando esta ratio es baja, la angiogénesis tumoral está bloqueada o disminuída; por el contrario, cuando esta ratio es alta, el interruptor angiogénico se enciende. Resulta muy importante el hallazgo de Dameron et al<sup>219</sup> de que la pérdida de la función de un tipo del gen supresor p53 resulta en una pérdida de la expresión de TSP. Este hallazgo no sólo establece una posible asociación entre las bases genéticas del cáncer y la angiogénesis tumoral. Además abre un nuevo campo de investigación sobre los inhibidores endógenos de la angiogénesis. En la actualidad está ampliamente reconocido que los oncogenes, como las mutaciones *ras* o *src*, pueden contribuir también a la angiogénesis mediante la estimulación de la producción de moléculas proangiogénicas como el VEGF<sup>232-234</sup>. Estos efectos han sido progresivamente descubiertos en el campo de los

oncogenes y los genes supresores tumorales, desde el empleo predominante de cultivos de células tumorales puras para estudiar las alteraciones funcionales de la genética que inducen el desarrollo tumoral.



**Figura 27.** Diferentes mecanismos de actuación de los factores antiangiogénicos.

## Utilidad clínica de la angiogénesis

### Valor pronóstico de la angiogénesis tumoral

En términos generales, las neoplasias benignas se encuentran escasamente vascularizadas y demuestran una tendencia al crecimiento lento, mientras que las neoplasias malignas están ricamente vascularizadas y suelen ser de crecimiento rápido. El incremento de vascularización también incrementa la posibilidad de que las células tumorales se incorporen al torrente circulatorio y den lugar a metástasis a distancia. Las tinciones inmunohistoquímicas en muestras de cáncer de mama con anticuerpos contra el factor VIII, una proteína expresada predominantemente en la superficie de las células endoteliales, han permitido determinar la densidad de la microvasculatura<sup>235</sup>. El número de microvasos en un campo microscópico obtenido de las áreas más



vascularizadas de la muestra histológica (hot spots) se correlaciona directamente con metástasis e inversamente con supervivencia.

Estudios más recientes han determinado que el incremento en la densidad de microvasos en áreas de mayor neovascularización es un indicador pronóstico significativo e independiente en cáncer de mama en estadios precoces<sup>235-242</sup>. En otras neoplasias también se ha encontrado justificación científica que soporte la hipótesis de que el índice de angiogénesis es un factor pronóstico de gran utilidad. En la década de los 90 se han publicado estudios relevantes en neoplasias de próstata<sup>243</sup>, melanoma<sup>244</sup>, carcinoma ovárico<sup>245</sup>, carcinoma gástrico<sup>246,247</sup>, o en colon<sup>248</sup>, entre otros. Sin embargo, la consideración de que el índice angiogénico puede contribuir a identificar pacientes con metástasis ocultas, o con elevada probabilidad de diseminación sistémica de la enfermedad, no se considera real hasta el momento por varias razones<sup>249</sup>. En primer lugar los tumores humanos son heterogéneos y constituidos por subpoblaciones celulares con propiedades diferentes<sup>250-252</sup>. La expresión heterogénea de esta actividad angiogénica se ha demostrado científicamente en varios cánceres humanos, como el renal<sup>253</sup> o el de colon<sup>254</sup>. En segundo lugar, el desarrollo de metástasis tumorales es un proceso secuencial y selectivo que consiste en una serie de pasos encadenados pero independientes unos de otros<sup>250,251,255</sup>. Para desarrollar metástasis clínicamente relevantes, las células tumorales deben completar todos los pasos secuenciales de esta "*cascada metastásica*". Por ejemplo, las células tumorales capaces de inducir procesos intensos de angiogénesis pero incapaces de sobrevivir en torrente circulatorio o de proliferar en órganos distantes no producirán metástasis<sup>250,251,255</sup>. Por lo tanto, al igual que ocurre con otros pasos de la cascada metastásica, el desarrollo de procesos de angiogénesis es necesario, pero no suficiente, para la patogénesis de metástasis tumorales (figura 18). En tercer lugar, aunque no todos los tumores con gran actividad angiogénica desarrollan metástasis, la inhibición de la angiogénesis previene el crecimiento y proliferación de células tumorales, tanto a nivel de la localización primaria como

en los focos metastásicos, y por lo tanto puede prevenir el desarrollo de metástasis clínicamente significativas<sup>224,225,231,255</sup>.

Para estudiar la angiogénesis en tejidos tumorales mediante la tecnología actual es necesario obtener tejido suficiente para examen histológico del mismo. El criterio estándar para este examen histológico de piezas tumorales consiste en destacar el endotelio tumoral mediante anticuerpos que diferencien las células endoteliales de otras estirpes celulares del tumor<sup>256</sup>. El primer anticuerpo utilizado fue el factor VIII-RA (FVIII-RA), y éste es todavía el anticuerpo utilizado en muchos de los estudios publicados. Otros anticuerpos específicos de las células endoteliales que se han utilizado en estudios de angiogénesis tumoral son el CD31/PECAM, el CD34, CD36, TEC-11, y el ulex europaeus (UEA). En la actualidad, los anticuerpos más utilizados son FVIII-RA, CD31 y CD34. Una vez completada la preparación de la muestra histológica, es necesario cuantificar el grado de angiogénesis existente en la masa tumoral. Por ejemplo, el investigador puede elegir las cinco áreas más vascularizadas de la masa tumoral mediante un scanning de la misma a pocos aumentos, y entonces realizar el conteo vascular en dichas áreas a mayor magnificación del campo microscópico. En determinados tumores, como ocurre en los de estirpe epitelial del aparato digestivo, es necesario precisar la localización del área de conteo, puesto que puede ser próxima a los márgenes invasores del tumor, lo que alteraría significativamente el resultado con respecto, por ejemplo, a áreas distantes de los bordes del tumor<sup>246,248</sup>. El número de vasos sanguíneos en muestras tumorales individualizadas se puede cuantificar bien mediante el conteo de vasos en un campo microscópico de gran aumento o bien mediante la media del conteo de vasos en varios campos microscópicos.

En este sentido, además de la controversia que despierta el método de conteo vascular, se añaden discrepancias sobre la clasificación de esa actividad vascular. Una opción es clasificar el grado de vasculatura en una escala de 0 a 3, siendo el grado 3 el más vascularizado. Esta clasificación tiene el inconveniente de ser un método subjetivo, y por lo tanto sujeto a problemas de reproducibilidad. Otro método de clasificar el nivel de angiogénesis sería



destacar los vasos mediante su marcaje con anticuerpos específicos de células endoteliales, y con la ayuda de las técnicas de imagen digital determinar las áreas del tumor constituídas por mayor cantidad de células teñidas. Un tercer método sería determinar el número de ramificaciones de los vasos del interior del tumor. Finalmente un método frecuentemente empleado es el método de Chalkley-Grid<sup>257</sup>. En esta metodología, una muestra macroscópicamente marcada con barras superpuestas se utiliza para visualizar un campo de gran aumento del tumor teñido con un anticuerpo específico de células endoteliales. Se procede a contar las áreas donde las células endoteliales se entrecruzan con las barras, y la suma total de esas cuantificaciones constituye el denominado índice de Chalkley.

El reconocimiento de que un tumor con elevado índice angiogénico se puede asociar a una mayor capacidad metastásica sugiere que estos pacientes son los que más se pueden beneficiar potencialmente de una terapia adyuvante. En un estudio que evaluaba el valor pronóstico de la angiogénesis en neoplasias pulmonares en estadios avanzados y resecaos mediante cirugía se encontró que la respuesta a terapia adyuvante mejoraba la supervivencia global de esos pacientes con un elevado índice angiogénico, pero no en pacientes con actividad angiogénica reducida<sup>258</sup>. Sin embargo, la observación de que pacientes con tumores altamente angiogénicos se benefician de terapias adyuvantes no es universal. En estudios de neoplasias de mama con afectación ganglionar tratados mediante quimioterapia adyuvante o terapia hormonal se comprobó que aquellos tumores con alta densidad de microvasos presentaban un pronóstico peor que aquellos pacientes cuyos tumores tenían baja densidad microvascular, independientemente de las terapias adyuvantes empleadas<sup>259,260</sup>. De hecho, un reciente estudio de Gasparini et al<sup>261</sup> sugería que pacientes con una expresión reducida de VEGF presentaban consecuencias más favorables secundarias a terapia adyuvante.

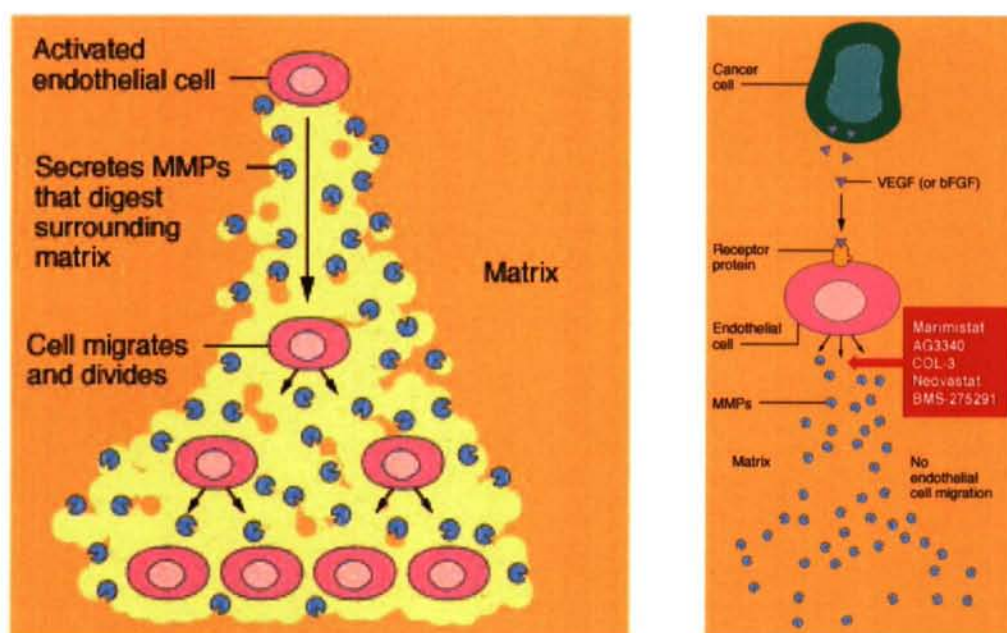
Los tumores con un elevado índice angiogénico pueden representar una variante biológicamente más agresiva de la enfermedad, contra la que las

terapias adyuvantes convencionales no son efectivas. Probablemente en estos pacientes estaría indicada una terapia antiangiogénica.

### Introducción a las estrategias antiangiogénicas

Los agentes antiangiogénicos utilizados en la práctica clínica actual se pueden clasificar en una gran variedad de familias amplias basándonos en la actividad biológica de los compuestos utilizados.

La primera clase de compuestos, los *inhibidores de metaloproteinasas*, bloquean la degradación de la membrana basal. La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha sobre estos agentes son estudios en fase I, en que se ha valorado que su mayor toxicidad viene determinada por dolor articular y músculo-esquelético debido a defectos en la remodelación del colágeno.

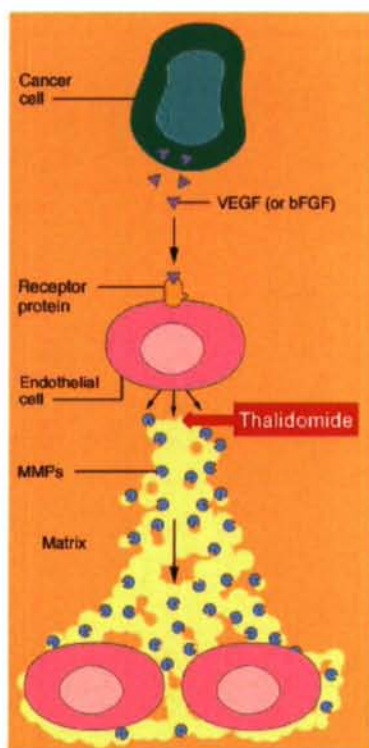


**Figura 28.** Las metaloproteinasas (MMP) son proteínas secretadas por células endoteliales que destruyen la matriz extracelular y favorecen la migración celular (imagen izquierda). Los inhibidores de MMPs bloquean este proceso, y por tanto la progresión de células tumorales (imagen derecha).

Un segundo tipo de agentes antiangiogénicos es el constituido por la familia de los *inhibidores de la función de las células endoteliales*. Entre ellos se incluye el TNP-470, la talidomida, la escualamina, el combretastatin A-4 prodrug, y la endostatina. Los efectos biológicos de estas drogas son incluso

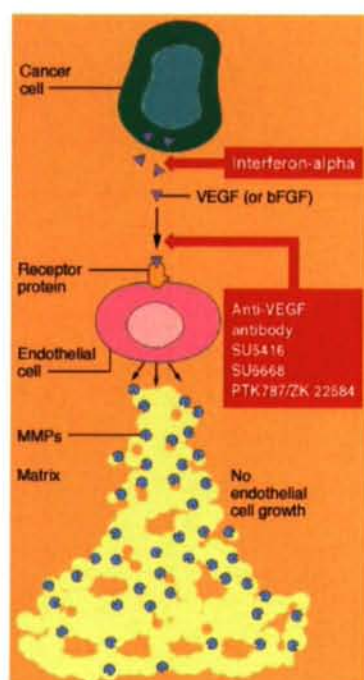


menos conocidos que los del primer grupo de agentes, y muchos de los estudios sobre ellas corresponden a ensayos clínicos en fases I y II.



**Figura 29.** Inhibición de la función de las células endoteliales producida por la talidomida.

Un tercer grupo de agentes antiangiogénicos tienen como objetivo específico uno o varios factores angiogénicos. Entre ellos se citan los *inhibidores tirosina-kinasa de receptores de factores como VEGF, bFGF y PDGF*. Además existen ensayos clínicos con anticuerpos dirigidos específicamente contra esos receptores o contra los mismos factores. En ensayos preclínicos en modelos animales, la mayoría de estos agentes inhibían el crecimiento tumoral, pero muy pocos causaban regresión tumoral. Esto sugeriría que las terapias antiangiogénicas no serían apropiadas para conseguir regresión tumoral, principal objetivo de cualquier tratamiento quimioterápico citotóxico. Por lo tanto sería preciso redefinir los objetivos terapéuticos para valorar los resultados de determinadas terapias biológicas.



**Figura 30.** Inhibidores de los mecanismos inducidos por factores angiogénicos.

Debido al reciente descubrimiento de que la supervivencia de las células endoteliales es fundamental para el desarrollo de una trama de neovasos, se está comenzando a introducir nuevas drogas en ensayos clínicos que tienen como diana los factores de supervivencia de estas células endoteliales. Entre ellas se incluyen *antagonistas de elementos estructurales presentes en la superficie de las células endoteliales*. Al mismo tiempo, se ha descubierto que el VEGF es también un factor de supervivencia de las células endoteliales. Por lo tanto, cualquier terapia con efecto anti-VEGF atentaría igualmente contra la supervivencia de células endoteliales.

### Actividad antiangiogénica del interferon

La familia del interferón (IFN) está constituida por tres grandes glicoproteínas que muestran diferente especificidad: el IFN- $\alpha$  derivado de leucocitos, el IFN- $\beta$  derivado de fibroblastos, y el IFN- $\gamma$  producido por células inmunes. Aunque el IFN- $\alpha$  y el IFN- $\beta$  comparten un receptor común, el receptor IFN tipo I, e inducen un patrón similar de respuesta celular, determinadas reacciones celulares sólo pueden ser estimuladas por el IFN- $\beta$ , probablemente debido a la fosforilación de una proteína asociada al receptor que únicamente



responde al IFN- $\beta$ <sup>262</sup>. Además de la clásicamente conocida actividad antiviral, la familia de IFNs regulan múltiples actividades biológicas. Entre ellas cabría citar el crecimiento celular<sup>263</sup>, diferenciación<sup>264</sup>, expresión de oncogenes<sup>265</sup>, inmunidad de huésped<sup>266</sup>, y oncogenicidad<sup>267-269</sup>. Los IFNs también pueden inhibir una serie de pasos en el proceso de la angiogénesis (Figura 30). El IFN tiene propiedades antiproliferativas, especialmente de las células tumorales, un efecto que ha sido demostrado igualmente en células endoteliales *in vitro*<sup>270,271</sup>. El IFN- $\alpha$  puede inhibir la proliferación endotelial inducida por FGF<sup>272</sup>, y el IFN- $\gamma$  también puede inhibir la proliferación endotelial<sup>273</sup>. El IFN- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  han demostrado actividad citostática sobre las células endoteliales de los capilares humanos<sup>274</sup> y de los microvasos de la dermis humana<sup>275</sup>.

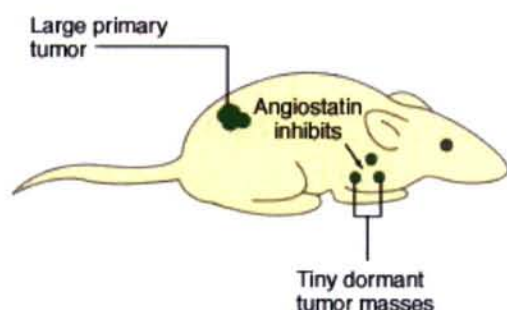
Las terapias sistémicas mediante IFN recombinante producen efectos antiangiogénicos en tumores vasculares, incluido el hemangioma infantil<sup>222,276,277</sup>, el sarcoma de Kaposi<sup>278</sup>, el tumor mandibular de células gigantes<sup>279</sup>, o el carcinoma vesical<sup>280</sup>. Asimismo se ha documentado que estos tumores son secretores de bFGF, a menudo a niveles detectables en la orina o el suero de los pacientes<sup>281,282</sup>. El IFN- $\alpha$  y el IFN- $\beta$ , pero no el IFN- $\gamma$ , reducen la expresión del mRNA y de la proteína del bFGF en las células carcinomatosas humanas<sup>221</sup>. Incluso se ha demostrado que la administración sistémica de IFN- $\alpha$  humano disminuye la expresión *in vivo* del bFGF, disminuye la densidad de vasos sanguíneos e inhibe el crecimiento tumoral de carcinoma vesical humano implantado ortotópicamente en ratones<sup>283</sup>.

#### 1.4.4. Terapia antiangiogénica

La comprensión de que la angiogénesis es esencial para el crecimiento y el desarrollo de metástasis ha llevado a la puesta en marcha de un gran esfuerzo investigador en busca de descubrir compuestos efectivos con actividad antiangiogénica. Sin embargo, los fenómenos de angiogénesis no sólo acontecen en procesos patológicos sino que también participan en la homeostasis. De esta forma, fenómenos fisiológicos de angiogénesis ocurren en

reproducción, cicatrización de heridas, o menstruación. Por lo tanto es preciso un adecuado balance entre la limitación de la angiogénesis para controlar el crecimiento tumoral y la producción de toxicidad en el huésped.

Además del problema de toxicidad potencial, la terapia antiangiogénica debe mantenerse crónicamente en este tipo de enfermedades. Dado que su objetivo último es reducir la proliferación de nuevos vasos sanguíneos, es necesario redefinir patrones que categoricen el éxito o fracaso de estas terapias. Por ejemplo, se considera que una respuesta adecuada al tratamiento quimioterápico estándar es la remisión del tamaño tumoral en un 50% en un determinado tiempo. Sin embargo, la terapia antiangiogénica es capaz de producir estabilización de la enfermedad, es decir, cronificación del tumor, no remisión tumoral, lo que siguiendo los criterios de éxito terapéutico mencionados sería considerado como un fracaso terapéutico. Por lo tanto, para evaluar la efectividad de la terapia antiangiogénica, tanto en el laboratorio como en la clínica, es preciso rediseñar nuevos criterios para considerar los resultados.



**Figura 31.** Cronificación del tumor ("masas tumorales durmientes") mediante terapia antiangiogénica.

Dado que, como hemos dicho, la terapia antiangiogénica cronifica el tumor y no lo reduce, es probable que estas drogas precisen ser utilizadas de forma mantenida. Por tanto, deben ser de fácil administración (por ejemplo, vía oral) y tener efectos secundarios a largo plazo. Se debe asimismo considerar que la evaluación de sus efectos será valorada a más largo plazo que los de la



quimioterapia, puesto que la estabilización de la enfermedad no puede ser evaluada a corto plazo.

A pesar de todo esto, existen algunos trabajos en la literatura que reportan una remisión tumoral completa en modelos experimentales de terapia antiangiogénica<sup>225,284</sup>. Sin embargo, la gran mayoría de estudios demuestran que la terapia antiangiogénica se limita a inhibir el crecimiento tumoral<sup>285,286</sup>, pero no a producir directamente una regresión en el tamaño tumoral.

Está claro que los endotelios de diferentes órganos son fenotípicamente diferentes<sup>287</sup> y que las terapias efectivas en una localización pueden ser inefectivas en otras. Además, otra diferenciación proviene de que el crecimiento y los patrones de metástasis son dependientes del sitio de inyección de células tumorales<sup>288</sup>. Por lo tanto, el modelo más idóneo para evaluar la terapia antiangiogénica sería un modelo ortotópico en el que el tumor estuviera creciendo en el ambiente apropiado del huésped. Incluso, a la hora de diseñar estudios experimentales o de interpretar la literatura, es fundamental determinar si la terapia antiangiogénica está siendo utilizada como (1) un agente quimiopreventivo (liberado previa o simultáneamente a la inoculación tumoral), (2) una terapia adyuvante (utilizado cuando el tumor es de tamaño relativamente reducido, como ocurriría al poco tiempo de la inoculación tumoral), o (3) una modalidad terapéutica (aplicada a animales con tumores establecidos).

A la hora de evaluar la respuesta a terapia antiangiogénica, se precisa definir los objetivos específicos previamente al inicio del estudio. Lógicamente, la medición de masa o tamaño tumoral será determinado al principio y al final del estudio. Como método sencillo de valorar la actividad terapéutica, se pueden tomar biopsias de zonas accesibles del tumor para estudio inmunohistoquímico y conteo de vasos, proliferación de células tumorales e índices de apoptosis, y proliferación de células endoteliales e índice de apoptosis. De mayor utilidad global sería realizar estudios de supervivencia oncológica para determinar la efectividad de la terapia antiangiogénica.

Datos preliminares de estudios preclínicos existentes hasta el momento sugieren que la eficacia de un fármaco citotóxico convencional se ve incrementada con la asociación de un inhibidor de la angiogénesis<sup>289</sup>. De hecho, varios ensayos clínicos sobre antiangiogénicos actualmente en curso han sido diseñados para comparar los efectos de un agente citotóxico aislado con los efectos del mismo agente combinado con un inhibidor de angiogénesis. En concreto, el trastuzumab (Herceptin®) ha demostrado esperanzadores resultados en mejorar los efectos terapéuticos de los quimioterápicos en una proporción considerable de pacientes con estadios avanzados de cáncer de mama<sup>290</sup>.

En otros estudios en fase preclínica se ha observado que estrategias dirigidas a reducir la vascularización pueden producir regresión tumoral aguda. Por ejemplo, ciertos agentes con afinidad por la tubulina de las paredes vasculares, como el combretastatin A-4, pueden producir este efecto<sup>291-293</sup>, al igual que anticuerpos que desarrollan mecanismos que desencadenan en una respuesta de trombosis intravascular<sup>294</sup>. Estas drogas actúan destruyendo células endoteliales de vasos de reciente formación produciendo un colapso vascular que da lugar a la destrucción de una cantidad mucho mayor de células tumorales. Lógicamente, en este caso el problema radica en desarrollar agentes capaces de producir este efecto sin desarrollar efectos tóxicos secundarios, que incluso podrían ser amenazantes para la vida. En este sentido, se está abriendo una potencial vía investigadora basada en los conocimientos del genoma para discernir marcadores moleculares específicos de las células endoteliales activadas de los vasos tumorales recientemente formados.

En el momento actual, el principal factor limitante en el desarrollo de nuevos agentes antiangiogénicos lo constituye esta ausencia de especificidad por las células vasculares tumorales. Ello determina un elevado potencial de aparición de toxicidad asociada con terapia crónica antiangiogénica, especialmente relacionada con alteraciones en el crecimiento y regeneración tisular, o en la regulación de mecanismos fisiológicos imprescindibles como la cascada de la coagulación.



Independientemente de todo ello, conviene recordar que un elemento terapéutico esencial en el tratamiento del cáncer, incluido el de cabeza y cuello, es el efecto de las radiaciones ionizantes, cuyos mecanismos de actuación también se basan, entre otras, en propiedades antiangiogénicas per sé<sup>295-297</sup>. Incluso, existen evidencias de que la modulación de receptores asociados al proceso angiogénico modifica la respuesta tumoral ante la radioterapia<sup>298-300</sup>. De todas formas, los mecanismos de actuación permanecen controvertidos, puesto que también existen publicaciones que refieren efectos adversos en forma de intensificación de la regeneración angiogénica durante la radioterapia en el tratamiento de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello asociado con fracaso terapéutico<sup>301</sup>.

### **Terapia antiangiogénica como componente de otros regímenes terapéuticos antineoplásicos**

Ya hemos comentado previamente que la combinación de una o varias drogas con actividad antiangiogénica y agentes citotóxicos convencionales puede mejorar significativamente la eficacia antitumoral del citotóxico<sup>289</sup>. Y también que estos efectos potenciadores de terapias combinadas se han observado igualmente para la asociación de agentes antiangiogénicos con radioterapia<sup>296-300,302</sup>.

Una aproximación más racional, aunque futurista, al tratamiento de pacientes neoplásicos sería determinar las alteraciones moleculares que conducen a los múltiples procesos involucrados en el crecimiento tumoral. La angiogénesis es simplemente un componente de dicho proceso de desarrollo tumoral y de metástasis, y es preciso estudiar la sobreexpresión de otros genes involucrados en la protección de la apoptosis, la proliferación celular o la invasión tisular. Con el fulgurante desarrollo de la tecnología génica puede ser posible en el futuro determinar la huella genética individual de un tumor, y así desarrollar terapias específicamente dirigidas a combatir su fenotipo molecular. La terapia antiangiogénica debe ser un componente de la terapia biológica frente al cáncer, desarrollada en combinación con factores anti-crecimiento o

con agentes inductores de la apoptosis de células tumorales y de células endoteliales de la vascularización tumoral.

### **Terapia génica y antiangiogénica**

Numerosos estudios genéticos relacionan la sobreexpresión o la supresión de determinadas secuencias génicas con la aparición, proliferación y desarrollo tumoral. La *inestabilidad genética* se considera un marcador definitorio de las células cancerosas. Una de las principales líneas de trabajo en terapia oncológica se basa en actuación sobre esa inestabilidad genética del cáncer.

Está demostrado que estas alteraciones genéticas constituyen el principal mecanismo de resistencia adquirida a la acción de agentes antineoplásicos. Los inhibidores de la angiogénesis son drogas anticáncer de reciente aparición, y son considerados como potencialmente capaces de minimizar o retrasar significativamente el desarrollo de resistencia adquirida a drogas antineoplásicas. Este mecanismo parece debido a que actúan contra las células endoteliales normales del huésped – y por tanto, genéticamente estables-, que determinan el crecimiento vascular tumoral. Esta es una de las observaciones que permiten considerar que la asociación de una droga con actividad antiangiogénica favorece significativamente la respuesta tumoral ante determinadas estrategias terapéuticas.

El gen supresor de tumores *p53* está inactivado en la mayoría de los cánceres humanos<sup>303</sup>. Las mutaciones genéticas como ésta, detectadas comúnmente a nivel citológico tumoral, pueden hacer a las células menos susceptibles a la apoptosis inducida por mecanismos de estrés celular como hipoxia<sup>304</sup>. De hecho, está demostrado que las células tumorales con deficiente expresividad del gen supresor de tumores *p53* muestran un potencial reducido de experimentar apoptosis bajo condiciones hipóxicas, una circunstancia que puede reducir su dependencia del aporte vascular, y de esta manera minimizar su capacidad de respuesta a terapia antiangiogénica. Yu et al<sup>217</sup>, en una



publicación de 2002, realizaron un estudio experimental en ratones portadores de tumores colorrectales humanos que habían alcanzado un tamaño de 100 mm<sup>3</sup>. Los investigadores trataban esos ratones con una combinación de quimioterapia con vinblastina a baja dosis (0.5 mg/kg) y DC101, un anticuerpo dirigido contra el receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR-2). Aunque el crecimiento tumoral resultaba inhibido por esta estrategia terapéutica, encontraron una diferencia dramática de respuesta en función del status del *p53*. En controles a los 42 días de tratamiento, el volumen de tumores *p53*<sup>-/-</sup> se había incrementado 7 veces, mientras que en tumores *p53*<sup>+/+</sup> sólo se había incrementado 2 veces. Resultados similares obtuvieron con el empleo únicamente del DC101 como estrategia terapéutica, de donde se deduce que los resultados no son dependientes de la quimioterapia con vinblastina.

Los tumores *p53*<sup>-/-</sup> respondían más lentamente a la terapia con vinblastina y DC101.

Además Yu et al demostraron que las células cancerosas que habían perdido su función *p53* (*p53*<sup>-/-</sup>) sobrevivían mejor a esta estrategia terapéutica. La proporción de células *p53*<sup>+/+</sup> se veía drásticamente reducida durante la terapia antiangiogénica..

En esa misma publicación, Yu et al estudian también la distribución de células *p53*<sup>+/+</sup> y *p53*<sup>-/-</sup> en relación con la vascularización de un tumor heterogéneo. Si las células *p53*<sup>+/+</sup> son más sensibles a la muerte inducida por hipoxia, esas células deberían ser predominantes en regiones tumorales perivasculares ricas en oxígeno y otros nutrientes. Mediante estudios de inmunofluorescencia los autores demostraron que la mayor proporción de células *p53*<sup>+/+</sup> de un tumor heterogéneo se localizan efectivamente adyacentes a áreas de mayor perfusión vascular, y son selectivamente destruídas en regiones alejadas de vasos tumorales. Esta observación resulta consistente con la hipótesis de que las células *p53*<sup>+/+</sup> son más susceptibles de experimentar apoptosis inducida por hipoxia. Por tanto, la frecuencia de apoptosis en áreas

hipóxicas de tumores  $p53^{+/+}$  es mayor que en áreas hipóxicas de tumores  $p53^{-/-}$ .

Todos estos estudios demuestran que la información genética de una célula tumoral constituye un determinante importante de la respuesta a la terapia antiangiogénica. Las mutaciones en la expresividad del  $p53$  representan tan solo un ejemplo de alteraciones genéticas asociadas a dependencia vascular o sensibilidad a la hipoxia de las células tumorales. Otras alteraciones oncogénicas, por ejemplo en relación con oncogenes *ras*, *src* o HER-2, también pueden modificar la respuesta celular ante situaciones de hipoxia y, por tanto, la capacidad de supervivencia tumoral ante situaciones de estrés<sup>305-307</sup>.

De todo ello se deduce que la investigación genética puede aportar nuevos impulsos a los conocimientos en angiogénesis y en terapia antiangiogénica. En este sentido existen estudios en fase clínica sobre estrategias terapéuticas basadas en combinación de una o varias drogas con actividad antiangiogénica con agentes inhibidores de la señal transductora mediada por oncogenes<sup>306-308</sup>, citoxinas inductoras de hipoxia celular<sup>309</sup>, o con agentes destructores de los vasos sanguíneos tumorales ya existentes<sup>310</sup>. Así, en los últimos años hemos asistido a la comercialización de nuevas herramientas farmacogenéticas contra el cáncer. Los dos pioneros, el imatinib (Glivec®) y el trastuzumab (Herceptin®), son moléculas que respectivamente actúan contra la tirosin-quinasa y frente al dominio extracelular del receptor de superficie HER2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano). En cabeza y cuello destacan el erlotinib (Tarceva®)<sup>311</sup> y el cetuximab (Erbix®)<sup>312</sup>, que actúan frente al receptor EGFR.

En la práctica clínica, todas estas líneas investigadoras pueden derivar en un cambio de actitud ante los procesos oncológicos. No sólo son estudios interesantes de cara a conocer los mecanismos de progresión del cáncer, sino también a determinar cómo combatirlo. Por ejemplo, estos estudios de terapia antiangiogénica sólo o asociada a otras estrategias terapéuticas nos están



aportando datos relevantes sobre respuesta tumoral a armas terapéuticas clásicas como son la quimioterapia y la radioterapia.

#### 1.4.5. Angiogénesis y cáncer oral

En la actualidad está bien establecido que la progresión del crecimiento tumoral más allá de un determinado límite, de 3 a 5 mm<sup>3</sup>, requiere el reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos<sup>313-316</sup>. Por tanto, el tamaño tumoral y su progresión, incluyendo su potencial metastásico, dependen en gran medida de que el tejido tumoral pueda estimular una respuesta angiogénica en el huésped. El tamaño crítico del tumor está limitado por la difusión de nutrientes y la actividad metabólica mediante productos que permitan el crecimiento de la masa tumoral. La imposibilidad de desarrollar adecuados mecanismos de neovascularización conduciría irremediablemente a la necrosis de la masa tumoral<sup>317-319</sup>.

Los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello se presentan con frecuencia con masas de varios centímetros de diámetro. Estos tumores deben ser capaces de desarrollar una respuesta angiogénica para alcanzar estas dimensiones<sup>320</sup>.

La angiogénesis es un proceso que viene determinado por la interacción entre células endoteliales, elementos de la matriz de tejido conectivo, y factores solubles<sup>321,322</sup>. El desarrollo de nuevos vasos se desencadena mediante la liberación de polipéptidos que funcionan como señales de crecimiento autocrinas y paracrinas entre las células tumorales y los tejidos vecinos<sup>124,194,317,323</sup>, y que pueden ser inhibidas por varias sustancias con capacidad angiostática<sup>324-326</sup>. En la biología de estos tumores, el papel del óxido nítrico (NO) y su interacción con la vascularización tumoral ha sido motivo de gran atención e investigación en los últimos años<sup>327,328</sup>.

En los tumores sólidos se ha sugerido que un alto grado de vascularización proporcionaría mejor accesibilidad al sistema circulatorio. De esta forma se facilitaría la diseminación sistémica de células tumorales

procedentes de la lesión primaria. Esta hipótesis se ha corroborado en recientes estudios sobre la actividad angiogénica en cáncer de mama que muestran que, en estadios precoces del tumor, la intensidad de la neovascularización tumoral constituye un importante factor predictivo de la supervivencia global y libre de enfermedad<sup>329</sup>. La relación existente entre incidencia de metástasis y densidad de neoformación de microvasos ha sido demostrada en otros tipos de tumores, tales como melanoma cutáneo, cáncer pulmonar no de células pequeñas, cáncer de testículo, cáncer de próstata y cáncer de cabeza y cuello<sup>243,330-334</sup>.

Los cánceres de cabeza y cuello han demostrado capacidad de inducir una respuesta angiogénica en modelos experimentales<sup>335</sup>. En su trabajo, publicado en 1993, Petruzelli et al<sup>335</sup> realizan un estudio comparativo entre el potencial angiogénico de tumores de cabeza y cuello y tejidos no neoplásicos de control. Para ello utilizan 80 muestras tumorales confirmadas histológicamente de 10 pacientes que inyectan en la membrana corioalantoica de embriones de pollo. De ellos sobrevivieron 44 embriones (55%) y fueron evaluados histológicamente en el día 17 después de la inducción tumoral. Se encontró invasión tumoral del mesodermo de la membrana corioalantoica en 30 de los 44 embriones supervivientes (68%). Previamente se realizó una cuantificación de la respuesta angiogénica por observadores "ciegos". En los casos con invasión tumoral se objetivó una respuesta angiogénica significativamente mayor ( $p=.01$ ) que en los controles sin tumor. Los autores concluyeron que los carcinomas escamosos de cabeza y cuello pueden inducir respuesta angiogénica in vivo, presumiblemente secundaria a la producción de un factor angiogénico no identificado.

A pesar de éste y otros estudios, la relación existente entre angiogénesis tumoral y metástasis y supervivencia oncológica en el área de cabeza y cuello no está totalmente definida<sup>336</sup>. Algunos estudios sobre tumores en distintas localizaciones de esta área y diferentes estadios tumorales han demostrado una correlación entre incremento de densidad de microvasos y desarrollo de metástasis<sup>334</sup>. Penfold et al<sup>337</sup> encontraron correlación entre conteo de microvasos tumorales y metástasis linfáticas ( $p<0.001$ ). Dray et al<sup>338</sup> limitaron



su estudio a tumores en estadios T1-T3 N0 M0, sin considerar localización de lesión primaria, y no encontraron correlación con supervivencia, metástasis ni aparición de recidivas.

Lentsch et al<sup>339</sup> han publicado recientemente un estudio sobre densidad de microvasos en carcinomas escamosos de cabeza y cuello, cuantificada mediante CD 31 y estableciendo correlación con el estadio tumoral. En dicho estudio, encuentran relación estadísticamente significativa ( $p < .01$ ) entre densidad microvascular y tamaño tumoral (T), de forma que el conteo vascular es mayor en estadios avanzados (T3 y T4) que en estadio precoces (T1 y T2). También encuentran una tendencia estadística, sin significación, hacia incremento de densidad microvascular en relación con estadio N. Los autores concluyeron que existe una fuerte correlación entre densidad de microvasos en hot-spots de tumores primarios y tamaño tumoral (T), y lo interpretan como que la angiogénesis tumoral desempeña un papel importante en la progresión tumoral.

Zatterstrom et al<sup>340</sup> examinaron un grupo de pacientes tratados primariamente con radioterapia y encontraron correlación positiva entre densidad de microvasos y respuesta terapéutica.

El tratamiento de los tumores de cabeza y cuello involucra a una serie de estructuras que desempeñan un papel crucial en varias funciones vitales. De esta forma, el precio de una potencial curación puede ser una considerable morbilidad. Las consecuencias clínicas de estas mutilaciones, ya sea quirúrgicas o promovidas por la radioterapia, muchas veces son impredecibles. Por tanto es fundamental el reconocimiento de factores pronósticos que puedan servir de guía para realizar un adecuado e individual análisis de la relación beneficio-coste que se asocia a la planificación terapéutica en cada caso.

En la literatura médica existen escasos estudios sobre la influencia de la angiogénesis en localizaciones específicas de tumores de cavidad oral, e incluso los resultados obtenidos han sido contradictorios<sup>341,342</sup>. Esto podría ser debido a la gran variedad en vascularización existente entre las diferentes localizaciones anatómicas de la cavidad oral<sup>343</sup>. Por ello algunos autores han realizado

estudios previos sobre la densidad de microvasos en tumores en estadios iniciales de cavidad oral, en los que se encontró una gran vascularidad, aunque sin correlación significativa con el comportamiento tumoral<sup>344</sup>. Algunos estudios<sup>345</sup> apuntan una mayor vascularidad en la periferia del tumor en fases iniciales de desarrollo tumoral. A medida que el tumor continúa creciendo, se produciría un mayor incremento de la vascularización intratumoral y neoformación vascular en correlación con progresión del cáncer oral.

Desde el punto de vista de la aplicación clínica, la producción de factores angiogénicos por los carcinomas escamosos de cabeza y cuello parece desempeñar un papel fundamental en el crecimiento progresivo y desarrollo de metástasis de estos tumores<sup>346-348</sup>. La identificación de estos factores y el conocimiento preciso de sus mecanismos de actuación puede permitir en un futuro próximo el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que utilicen antagonistas de dichos factores. En la actualidad existen varias líneas de investigación que han demostrado capacidad inhibitoria de la angiogénesis inducida por tumores de cabeza y cuello, tanto en estudios experimentales como in vivo<sup>349-354</sup>. Dentro de esta terapia molecular, algunos de estos estudios van más allá y no consideran mecanismos antiangiogénicos, sino que incluso ya hablan de moléculas antiangiogénicas específicas que participan en diferentes estrategias terapéuticas<sup>353,355-362</sup>. La escasa experiencia clínica que tenemos nos condiciona una actitud expectante y una cautela ante estas posibilidades terapéuticas, pero existen suficientes estigmas para pensar que el futuro de estas líneas de investigación es esplendoroso.

#### **1.4.6. Valor pronóstico de la angiogénesis en cáncer oral**

Estudios recientes han demostrado que la angiogénesis o neovascularización inducida por tumores es un marcador pronóstico en cáncer de mama, de pulmón y de próstata<sup>235,243,260,329,338</sup>.



Previamente hemos comentado que también existen estudios que correlacionan el grado de neoangiogénesis con la agresividad de carcinomas escamosos de cabeza y cuello. En concreto existen varios estudios de mediados de la década de los 90 que investigan la correlación estadística entre agresividad de cáncer de cabeza y cuello y angiogénesis<sup>338,340-344,363</sup>. En 1999, Herlyn<sup>364</sup> establece que las células endoteliales asociadas a neovascularización tumoral proliferan 20 a 2000 veces más rápidamente que las células endoteliales de tejido normal.

Sin embargo, algunos de estos estudios sobre cánceres de cavidad oral han obtenido resultados contradictorios<sup>365</sup>. Williams et al<sup>341</sup> evaluaron tumores T1-T3 de cavidad oral y encontraron correlación entre densidad de microvasos y desarrollo de metástasis y recurrencia tumoral. Li et al<sup>366</sup> encontraron que el conteo de microvasos en carcinomas epidermoides orales está relacionado con el tamaño (T), diferenciación tumoral y estadio de invasión. Kyzas et al<sup>367</sup> encontraron correlación entre expresión inmunohistoquímica de VEGF cuantificada con anticuerpo CD-34 y potencial invasor tumoral marginal y recurrencia local en carcinoma epidermoide de labio.

Por el contrario, Leedy et al<sup>342</sup>, en tumores T1 y T2 de lengua, no encontraron correlación significativa del grado de angiogénesis respecto al desarrollo de metástasis cervicales, ni al grado histológico de diferenciación ni al índice mitótico de las células tumorales. Dray et al<sup>338</sup> tampoco encontraron correlación estadística entre recuento de microvasos y enfermedad metastásica, recurrencia local o supervivencia de tumores de cabeza y cuello. Gleich et al<sup>344</sup>, en 1996, encontraron gran densidad vascular en tumores T1 de cavidad oral, pero no correlación con desarrollo de metástasis, recurrencia tumoral ni supervivencia global. Estos mismos autores, en una publicación posterior de 1997 sobre 31 carcinomas escamosos más avanzados (T2-T4) de suelo de boca y cara pélvica lingual<sup>343</sup>, tampoco encontraron correlación entre grado de angiogénesis y desarrollo de metástasis y/o recurrencia tumoral, ni con supervivencia global. En estos dos estudios encontraron que los tumores más

precoces T1 de cavidad oral presentaban mayor densidad de microvasos que tumores en estadios más avanzados T2-T4.

Ascani et al<sup>368</sup> no encontraron correlación estadística entre densidad de microvasos cuantificada con anticuerpo monoclonal anti-CD34 y parámetros clínico-patológicos como edad, sexo, localización tumoral y tamaño (T). Sin embargo encuentran significación estadística con respecto a grado histológico ( $p=0.0331$ ) y entre pacientes N positivos y negativos ( $p<0.0001$ .)

Entre las posibles razones que interpretaron para explicar que la densidad de microvasos no era un factor predictivo de desarrollo de metástasis y/o recurrencia tumoral ni de supervivencia tumoral, consideraron las siguientes:

- La región de cabeza y cuello está enormemente vascularizada. Por tanto, los tumores de esta área deben ser menos dependientes de neovascularización.
- Las alteraciones genéticas en tumores de cabeza y cuello pueden permitir su crecimiento en un medio anóxico, haciendo estos tumores menos dependientes de neoformación de vasos sanguíneos. Esto estaría en consonancia con el estudio de Graeber et al<sup>304</sup> que demostraron en animales de experimentación que las mutaciones del p53 pueden permitir crecimiento tumoral en áreas hipóxicas.
- Al evaluar la densidad de microvasos en tumores grandes resulta imposible evaluar todo el tumor. Deben existir áreas altamente angiogénicas que pasan desapercibidas pero que pueden condicionar el desarrollo de metástasis o recurrencia tumoral.
- La densidad de microvasos puede no ser un método adecuado de determinar el potencial de angiogénesis. Las tinciones que estos autores emplearon (FVIIIaG y CD31) no pueden distinguir entre vasos neoformados y vasos preformados. A



pesar de ello, estas mismas tinciones han demostrado alta correlación en tumores de otras localizaciones.

- Los pacientes de estos estudios fueron tratados mediante cirugía y radioterapia complementaria. La excisión quirúrgica del tumor puede limitar la importancia de la angiogénesis en la supervivencia tumoral. De todas formas, la angiogénesis puede ser un factor predictivo de respuesta a la radioterapia.

En relación con este último punto, Zätterström et al<sup>340</sup> encontraron correlación entre el grado de vascularización de carcinomas escamosos de cabeza y cuello con respuesta a radioterapia y sus consecuencias clínicas. En su muestra de pacientes incluyeron tumores de cabeza y cuello tratados con radioterapia preoperatoria o curativa. La proporción de pacientes con remisión completa fue significativamente mayor en pacientes con tumores con alto grado de vascularización (83%) que en los casos con menor grado de vascularización (46%). El análisis de supervivencia en relación a densidad de microvasos evidenció que los pacientes con tumores muy vascularizados presentaban una clara tendencia hacia mayor supervivencia que los pacientes con tumores poco vascularizados. Ello prueba una vez más que los tejidos adecuadamente oxigenados responden mejor a la radioterapia, y que la oxigenación de las células depende directamente de la densidad de vasos sanguíneos.

En los últimos estudios publicados, probablemente debido a la progresiva mejoría en cuanto a identificación de factores pro- y anti-angiogénicos, parece existir una mayor correlación entre actividad angiogénica y pronóstico de carcinoma escamoso de cavidad oral, incluido su potencial de desarrollar metástasis linfáticas cervicales<sup>369</sup>.

En pacientes orientales con carcinoma escamoso de cavidad oral asociado al consumo de betel, Wong et al<sup>370</sup> encontraron que tanto la máxima densidad microvascular como la inmunoreactividad al VEGF estaban estadísticamente asociadas con el desarrollo de metástasis linfáticas cervicales. También encontraron relación marginalmente significativa entre la densidad de microvasos y la supervivencia global. Estos datos sugieren que tanto la

densidad microvascular como la inmunoreactividad al VEGF pueden ser factores muy útiles para predecir la progresión tumoral del carcinoma escamoso de cavidad oral asociado al consumo de betel. Incluso este estudio concluye que la terapia antiangiogénica puede desempeñar un papel fundamental en reducir el desarrollo de metástasis regionales.

En la literatura reciente, también se encuentran estudios específicos sobre la influencia de la angiogénesis en la biología tumoral y el pronóstico del cáncer de lengua<sup>342,343,351,371-377</sup>. Sin embargo, la cuantificación de neovasos en esos trabajos se ha estudiado con anticuerpos diversos, lo que condiciona la interpretación de resultados y su aplicación clínica. En cáncer de lengua exclusivamente, no hemos encontrado ningún estudio que determinara la densidad microvascular mediante tinción con reactivo anti-CD105 y anti-CD31.



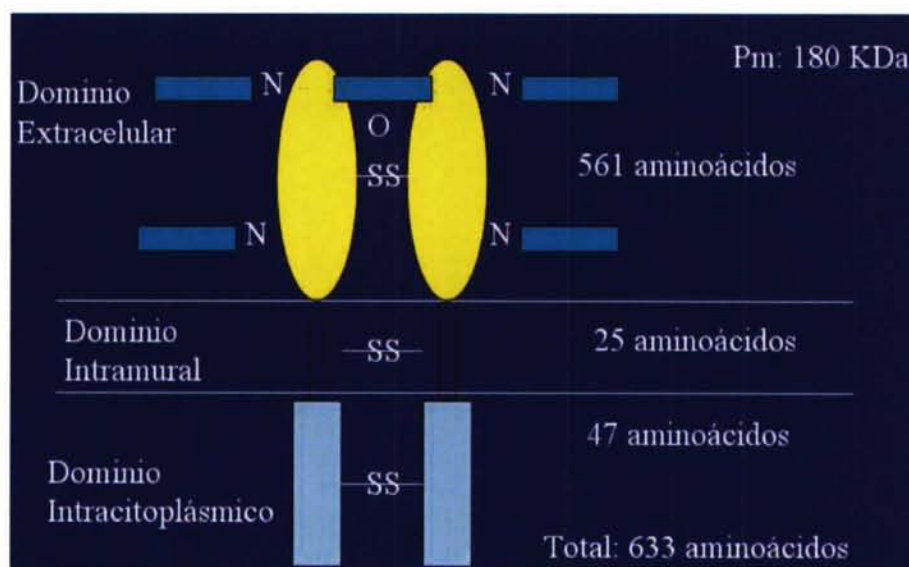
## 1.5. ENDOGLINA

### 1.5.1. Descripción

La endoglina, también denominada CD105, es una glicoproteína homodimérica de membrana que se expresa en grandes cantidades en las células endoteliales vasculares humanas. Inicialmente también se describió en proeritroblastos de la médula ósea, en monocitos activados y en linfoblastos de leucemia infantil<sup>378</sup>. Más recientemente, la endoglina se ha descrito como un componente del sistema receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) puesto que se puede unir al factor TGF- $\beta$ 1 con gran afinidad<sup>379</sup>. Por lo tanto, constituye un importante regulador de la proliferación y de la diferenciación de las células endoteliales vasculares humanas.

El CD105 es una glicoproteína homodimérica de membrana celular de aproximadamente 180 kDa, compuesta por subunidades con enlaces disulfuro de 95 kDa. Su expresión se estimula por el TGF- $\beta$ 1, uno de los factores de crecimiento implicados en la angiogénesis tumoral y en la regulación de la matriz extracelular<sup>380</sup>. El TGF- $\beta$ 1 se considera uno de los factores con capacidad inhibitoria más potentes que se conocen.

La secuencia primaria de cDNA aislada de células endoteliales humanas indicó que el CD105 es una proteína integral de membrana tipo I de 633 aminoácidos, con un dominio intramural de 25 aminoácidos, y un tallo intracitoplásmico de 47 aminoácidos<sup>381</sup>. La presencia de un tripéptido arginina-glicina-aspartato (RGD) en su dominio extracelular sugiere que el CD105 tiene una función de ligando para integrinas y/o otros receptores RGD<sup>381,382</sup>.



**Figura 32.** Estructura de la endoglina (CD105)

Las dos isoformas conocidas de la endoglina, L y S, difieren entre sí en la composición de aminoácidos de su dominio citoplasmático<sup>381,383</sup>. Ambas isoformas están fosforiladas, lo que sugiere su papel en modulación de señales moleculares y/o asociación citoplásmica con otras proteínas<sup>384</sup>. La L-CD105, la variante más larga con un tallo citoplasmático de 47 residuos aminoácidos, se expresa predominantemente en las células endoteliales, y comparte regiones de secuencia idénticas con betaglican, un componente del complejo del receptor TGF- $\beta$  que se expresa débilmente o está ausente en las células endoteliales<sup>379</sup>.

En el ser humano, el gen CD105 está localizado en el cromosoma 9q34→qter<sup>378</sup>. La región promotora del gen CD105 ya ha sido clonada y caracterizada<sup>380,385,386</sup>, y ha demostrado inducibilidad en la presencia del TGF- $\beta$ 1<sup>380</sup>. El promotor de CD105 tiene una afinidad mayor por las células endoteliales que por otras estirpes celulares como las epiteliales<sup>385</sup>. Esta marcada especificidad tisular de la transcripción del CD105 está probablemente regulada por distintos mecanismos que actúan en la región 5' del promotor<sup>385</sup>.

El importante papel que esta glicoproteína de membrana desempeña en la angiogénesis tumoral puede tener una significación considerable en la proliferación de los tumores de la economía orgánica, en su capacidad de



diseminación locoregional o sistémica, en el pronóstico tumoral, o en nuevas vías terapéuticas. Por ejemplo, su eliminación mediante terapia génica podría constituirse en los próximos años como una nueva arma terapéutica para el tratamiento de pacientes con cáncer.

### 1.5.2. Origen

La endoglina fue descrita por primera vez por Haruta y Seon en 1986<sup>387</sup>, quienes la identificaron como una glicoproteína de superficie en células inmaduras de leucemia. Fue identificada por un Mab llamado SNG. Inicialmente el antígeno (Ag) se denominó GP160, y se asoció a transformación-proliferación celular.

Posteriormente, en 1988, Gougos y Letarte cambian la denominación de esta glicoproteína por la de *endoglina*<sup>381,388</sup>.

Durante el V International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, se asignó a la endoglina el cluster de diferenciación (CD) número 105.

### 1.5.3. Conocimientos actuales

Las mutaciones en el gen CD105 están asociadas con la telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I (HHT1), una alteración vascular hereditaria autosómica dominante que se caracteriza por malformaciones arteriovenosas de predominio en pulmón y cerebro, y sangrados frecuentes – telangiectasias mucocutáneas, epistaxis, hemorragias gastrointestinales-<sup>389-392</sup>. La sintomatología clínica de la enfermedad es heterogénea entre diferentes familias, e incluso entre diferentes miembros de la misma familia. Los estudios experimentales en ratones carentes de CD105 sugieren que la haploinsuficiencia de CD105, combinada con los efectos de los genes reguladores de la expresión del TGF- $\beta$ 1, pueden condicionar la severidad de la telangiectasia<sup>392,393</sup>.

El CD-105 es un componente del complejo del receptor del TGF- $\beta$ <sup>379</sup>, una citoquina pleiotrópica que modula la angiogénesis mediante la regulación de diferentes funciones celulares, entre las que se incluyen proliferación, diferenciación y migración celular. También participa en otras funciones como síntesis de la matriz extracelular y hematopoyesis<sup>394,395</sup>. Es importante resaltar que tan solo el uno por ciento de las moléculas de endoglina detectadas en las células endoteliales se unen al receptor TGF- $\beta$ , y que recientes estudios han demostrado que la endoglina se une a diferentes componentes de la superfamilia del TGF- $\beta$ , incluidas la activina-A, la BMP-7 y la BMP-2<sup>396</sup>. Específicamente se une al TGF- $\beta$ 1 y  $\beta$ 3 con gran afinidad, gracias a su asociación complementaria con el receptor TGF- $\beta$  tipo II<sup>379,396,397</sup>. El papel exacto de la endoglina en la actividad del TGF- $\beta$  no es totalmente conocido. Sin embargo, sabemos que la sobreexpresión de endoglina modula diversas respuestas celulares del TGF- $\beta$ <sup>398,399</sup>.

Resulta interesante que la unión del TGF- $\beta$  al CD105 reduce los niveles de fosforilación del CD105<sup>384</sup>. La sobreexpresión de la endoglina antagoniza diversas respuestas celulares al TGF- $\beta$ 1, mientras que su expresión reducida potencia respuestas celulares al TGF- $\beta$ 1<sup>397-400</sup>. En este sentido, la inhibición de la expresión de CD105 en las células endoteliales de la vena umbilical humana incrementa la capacidad del TGF- $\beta$ 1 para suprimir su crecimiento, migración y capacidad de formación de tubos capilares<sup>399</sup>. Recientemente se ha demostrado que la endoglina afecta la respuesta celular al TGF- $\beta$  al interactuar sobre su dominio extracelular y citoplásmico en los receptores tipo I y II<sup>401</sup>.

Entre las moléculas de superficie expresadas en las células endoteliales, la endoglina (CD105) se está convirtiendo en una de las principales "dianas" vasculares en los estudios sobre terapia antiangiogénica del cáncer. El CD105 o endoglina es una glicoproteína de membrana celular que se encuentra principalmente expresada en las células endoteliales, y está sobreexpresada en el endotelio vascular asociado a tumores, donde funciona como un componente accesorio del complejo del receptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), y está involucrada en el desarrollo y maduración de vasos sanguíneos.



La teoría aceptada de que los tumores malignos dependen del mecanismo angiogénico para crecer y desarrollar metástasis<sup>402</sup> ha estimulado inusitado interés en la investigación de las potenciales implicaciones clínicas de la inhibición de la angiogénesis asociada a tumores<sup>403-405</sup>. Como hemos visto previamente, el objetivo de estas nuevas estrategias terapéuticas consiste en inducir regresión tumoral e inhibir la diseminación metastásica mediante el bloqueo de las necesidades nutritivas y el intercambio de oxígeno de las células tumorales. Las ventajas de las terapias oncológicas antiangiogénicas se basan en su capacidad para superar los problemas asociados a otras terapias oncológicas convencionales: aplicabilidad a neoplasias de diferentes estirpes histológicas, resistencia a fármacos, toxicidad y limitada especificidad por las dianas celulares<sup>403,405</sup>.

Además de las estrategias dirigidas a inhibir la actividad de los agentes proangiogénicos o tratamientos a base de inhibidores específicos de la angiogénesis, un curioso abordaje terapéutico se basa en atacar de forma selectiva las células endoteliales proliferantes en el interior de la masa tumoral. Sin embargo, no se han identificado marcadores específicos de las células endoteliales proliferativas ni moléculas capaces de discriminar entre células endoteliales de vasos sanguíneos de tejidos normales y neoplásicos. De todas formas, el hecho de que las células endoteliales de los vasos sanguíneos tumorales proliferen más rápidamente que las de los vasos normales<sup>406</sup> determina que las moléculas sobreexpresadas en la superficie de las células endoteliales en fase de proliferación activa constituyan dianas muy útiles sobre las que actuar.

### **Expresión tumoral del CD105**

El CD105 se encuentra principalmente presente en líneas celulares del sistema vascular y de los tejidos conectivos (Tabla 1). De hecho, el CD105 está fuertemente expresado en sincitiotrofoblastos de placenta terminal<sup>382,407</sup> y en células endoteliales vasculares<sup>388,407-409</sup>.

Histotipo	Referencias
Monocitos activados	Rokhlin et al <sup>410</sup> , 1995; Lastres et al <sup>398</sup> , 1996
Capa basal de túbulos seminíferos	Burrows et al <sup>408</sup> , 1995
Células de médula ósea	Gougos and Letarte <sup>388</sup> , 1998
Macrófagos diferenciados	Lastres et al <sup>382</sup> , 1992; O'Connell et al <sup>411</sup> , 1992
Células B inmaduras	Rokhlin et al <sup>410</sup> , 1995
Corazón embrionario	Qu et al <sup>412</sup> , 1998
Células endoteliales	Gougos and Letarte <sup>388</sup> , 1998; Wang et al <sup>407</sup> , 1993; Burrows et al <sup>408</sup> , 1995; Altomonte et al <sup>413</sup> , 1996; Miller et al <sup>409</sup> , 1999
Intersticio extracelular	Gougos and Letarte <sup>388</sup> , 1998
Precursores eritroides	Rokhlin et al <sup>410</sup> , 1995
Fibroblastos	Gougos and Letarte <sup>388</sup> , 1998
Células dendríticas foliculares	Burrows et al <sup>408</sup> , 1995
Matriz mesangial glomerular	Gougos and Letarte <sup>388</sup> , 1998
Células mesenquimales cardíacas	Qu et al <sup>412</sup> , 1998
Melanocitos	Altomonte et al <sup>413</sup> , 1996
Pulpa roja esplénica	Gougos and Letarte <sup>388</sup> , 1998
Células estromales	Rokhlin et al <sup>410</sup> , 1995; Robledo et al <sup>414</sup> , 1996
Componentes estromales de próstata	Burrows et al <sup>408</sup> , 1995
Red de CD34 circulante	Pierelli et al <sup>415</sup> , 2000
Sincitiotrofoblastos	Lastres et al <sup>382</sup> , 1992; Wang et al <sup>407</sup> , 1993
Células musculares lisas vasculares	Adam et al <sup>416</sup> , 1998

**Tabla 1.** Distribución in vivo de CD105 en tejidos normales. (Tomada de <sup>417</sup>)

La expresión del CD105 está básicamente restringida a las células endoteliales de los vasos sanguíneos en las que se detectan altos niveles de proteínas<sup>388,407,417</sup>. Incluso el CD105 está débilmente expresado en células progenitoras hematopoyéticas<sup>382,410,411,414,418</sup>, fibroblastos<sup>388,414</sup>, células estromales<sup>410</sup> y células vasculares de las fibras musculares lisas<sup>416</sup>, macrófagos<sup>382</sup>, y células mesangiales<sup>419</sup>. También se ha demostrado una estimulación de la expresión de CD105 durante la tabicación cardíaca y formación valvular<sup>412</sup>.

El CD105 está ausente o escasamente expresado en células endoteliales linfáticas aisladas de la piel humana<sup>420</sup>. Sin embargo, se detectan altos niveles de CD105 en endotelio de microvasos humanos, donde se encuentra asociado con betaglicano, un componente adicional del complejo del receptor del TGF- $\beta$ <sup>421</sup>.

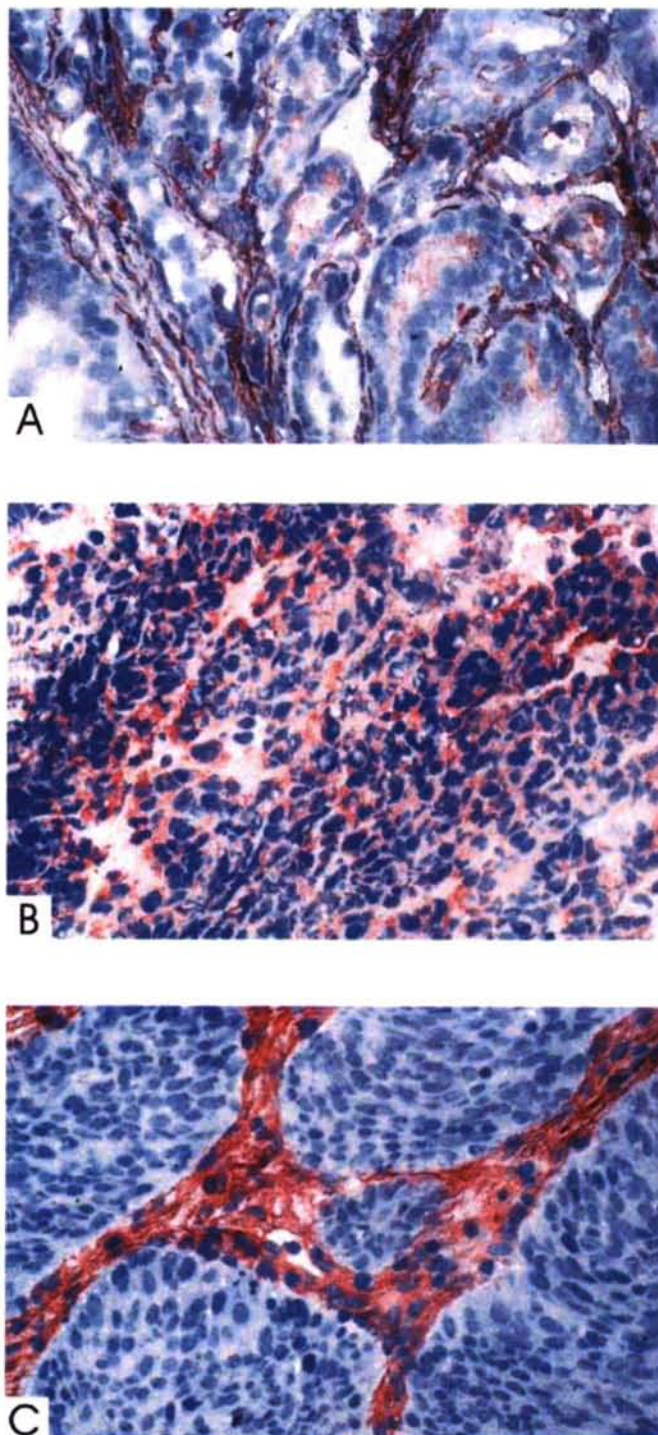
En tumores sólidos malignos, el CD105 se encuentra expresado de forma casi exclusiva en células endoteliales tanto de vasos peritumorales como intratumorales, así como en componentes del estroma tumoral<sup>407,408,417</sup>. Incluso



algunas células pequeñas y probablemente inmaduras de vasos tumorales son teñidas por anticuerpos monoclonales anti-CD105, como se ha demostrado en cánceres de próstata y de mama<sup>422,423</sup>. Aunque con baja frecuencia, el CD105 también se ha encontrado expresado en meningiomas<sup>417</sup>, sarcomas de diferentes estirpes<sup>417</sup>, en ovario<sup>424,425</sup>. (Tabla 2 y Figura 33)

Histotipo tumoral	Expresion (positive/tested)	
	vascular	celular
Angiosarcoma	2/2	1/2
Astrocytoma	9/9	0/9
Colorectal carcinoma	6/6	0/6
Endometrial carcinoma	3/3	0/3
Fibrosarcoma	2/2	1/2
Gastric carcinoma	6/6	0/6
Leiosarcoma	3/3	1/3
Liver carcinoma	4/4	0/4
Mammary carcinoma	30/30	0/30
Meningioma	2/2	1/2
Neurofibrosarcoma	3/3	0/3
Non-small cell lung cancer	9/9	0/9
Osteosarcoma	6/6	0/6
Ovarian carcinoma	10/10	0/10
Renal carcinoma	9/9	0/9
Synovial sarcoma	2/2	0/2

**Tabla 2.** Distribución in vivo del CD105 en tumours sólidos primarios de diferente histotipo. (Tomada de <sup>417</sup>)



**Figura 33.** Expresión de CD105 en tumores sólidos detectada mediante anticuerpo antiCD105 mAb MAEND3. (Magnificación x250). El anticuerpo tiñe la fina red capilar de una carcinoma papilar de tiroides (A), los vasos y el citoplasma de células tumorales de un leiomiosarcoma (B), y la red vascular y componente estromal de un carcinoma endometroide de ovario (C). (Tomada de <sup>417</sup>)

En el caso del melanoma, el CD105 ha sido detectado hasta en un 25% de casos primarios, y en un 34% de metástasis. En nevus intradérmicos se ha detectado en un 50%. La mayoría de las células metastásicas mostraban un



grado variable de expresión del CD105. Además, las células endoteliales de los vasos sanguíneos, aunque no las células musculares lisas, fueron intensamente teñidas en todas las investigaciones con anticuerpos monoclonales anti-CD105 MAEND3<sup>413</sup>. Con análisis mediante citometría de flujo se ha confirmado una expresión débil y heterogénea de CD105 en un gran número de células cultivadas de melanoma metastásico<sup>413</sup>.

En lo concerniente a los tumores hematopoyéticos, el CD105 se expresa en líneas celulares de leucemia pro-B y pre-B<sup>388,410</sup>, en neoplasias malignas derivadas de stem-cell como la anemia refractaria con exceso de blastos y en leucemia mieloide crónica con crisis de blastos<sup>426</sup>. En diferentes subtipos de leucemias agudas también se ha detectado CD105, en los subtipos celulares más inmaduros, pero no en los más diferenciados<sup>425</sup>. En un análisis actualizado de estos datos se ha encontrado que, entre las leucemias agudas estudiadas de novo, el CD105 se expresaba en un 47% de leucemias mieloides agudas, un 82% de leucemias linfoblásticas agudas de células B, y en un 7% de células T. (Tabla 3)

**Tipo Subtipo Positive/Tested<sup>a</sup>**

AML	97/207
AML-M1	23/65
AML-M2	40/85
AML-M3	0/43
AML-M4	22/82
AML-M5	6/19
AML-M6	3/6
AML-M7	3/4
B-ALL	190/239
Pro-B	14/18
COMMON	176/208
B	0/13
T-ALL	3/46
Pre-T	3/11
T	0/35

**Tabla 3.** Expresión de CD105 en leucemias agudas, detectado mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpo monoclonal antiCD105 MAEND3. (Tomada de <sup>417</sup>)

### **Forma soluble de endoglina (sCD105)**

La identificación de una forma soluble de CD105 (sCD105) en suero de pacientes sanos y de pacientes cancerosos<sup>427</sup> y en medios condicionados de células endoteliales y neoplásicas de diferente histotipo, sugiere que la liberación de CD105 es un proceso fisiológico, que acontece ante situaciones normales y patológicas. Incluso la cuantificación de niveles plasmáticos de sCD105 en individuos sanos y en pacientes de cáncer de mama sugiere que los niveles elevados de sCD105 pueden representar un marcador de actividad angiogénica, que podría ser útil para identificar pacientes con cáncer de mama con riesgo de desarrollar metástasis<sup>428</sup>. Las cantidades más altas de sCD105 circulante fueron detectadas en pacientes con cáncer de mama y colorectal con diseminación metastásica, y también en suero de pacientes que no recibieron quimioterapia<sup>429,430</sup>. Estos datos sugieren que la monitorización de los niveles de sCD105 puede identificar signos precoces de metástasis y/o de recidiva tumoral en el seguimiento de pacientes neoplásicos, y que el sCD105 circulante puede constituir un importante marcador de actividad angiogénica<sup>428-430</sup>.

Existen evidencias recientes de que en suero y plasma de pacientes con tumores sólidos y tumores hematológicos existen niveles elevados de una forma circulante soluble de CD105<sup>399,430,431</sup>. Estos hallazgos, aunque sean preliminares, parecen indicar que el sCD105 puede desempeñar un papel importante en la progresión del cáncer.

Respecto a las neoplasias hematopoyéticas, se han detectado niveles elevados de sCD105 tanto en leucemia mieloide aguda como en enfermedades mieloproliferativas crónicas<sup>431</sup>. También interesa remarcar que en pacientes con trombocitemia esencial con historia de complicaciones trombóticas se han detectado niveles muy bajos de sCD105, y una correlación inversa entre los niveles de sCD105 y los de TGF- $\beta$ 1 soluble. Por el contrario, en pacientes con trombocitemia esencial sin complicaciones trombóticas se detectaron niveles altos de sCD105 y una correlación directa entre los niveles de sCD105 y los de TGF- $\beta$ 1 soluble. Incluso a pesar del escaso número de pacientes de este estudio, estos hallazgos sugieren que los niveles circulantes de sCD105 pueden



afectar la bioactividad y la biodisponibilidad del TGF- $\beta$ 1 soluble en determinados tumores mieloides<sup>431</sup>.

En concordancia con estas evidencias, también se han identificado niveles elevados de sCD105 en pacientes con melanoma metastásico, lo que sugiere una potencial correlación entre niveles de sCD105 y progresión de la enfermedad<sup>417</sup>.

A pesar de estas evidencias preliminares, todavía se precisan más esfuerzos investigadores sobre las fuentes celulares del sCD105, su mecanismo de liberación plasmática y su potencial función.

### **Implicaciones funcionales en la angiogénesis, desarrollo vascular y progresión del cáncer**

Las evidencias preliminares sugieren la implicación del CD105 en la angiogénesis, y apuntan a la endoglina como un candidato poderoso a ser elemento diana sobre el cual actuar, acorde con su sobreexpresión en células endoteliales proliferantes, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*<sup>408,409,422,425</sup>. A este respecto, los niveles tan altos de expresión de CD105 en determinadas localizaciones como las células endoteliales de la vena umbilical humana, se asocian estrictamente a niveles de proteínas, DNA y RNA correspondientes a estados de activación y proliferación celular<sup>408</sup>. De acuerdo con estos hallazgos, se encontró correlación inversa significativa entre niveles de expresión de CD105 y densidad de células endoteliales de vena umbilical en cultivos celulares<sup>425</sup>. Además, se encontró que tinciones selectivas de anticuerpos monoclonales anti-CD105 son muy intensas en células endoteliales vasculares de tejidos en fases activas de angiogénesis, mientras que se detectó ausencia de tinción o tinción muy débil en vasos sanguíneos de tejidos normales<sup>407-409</sup>.

De acuerdo con el concepto de que la angiogénesis es estimulada por situaciones de hipoxia<sup>432</sup> y que el CD105 está sobreexpresado en la neovascularización de los tejidos angiogénicos<sup>408,433</sup>, se ha demostrado que los niveles de la proteína de superficie CD105 y sus niveles de transcripción y

promoción están moderadamente elevados ante condiciones de hipoxia vía el complejo del factor inducible de hipoxia (HIF)-1, y que esas condiciones de hipoxia y el TGF- $\beta$ 1 actúa de forma cooperativa para inducir la expresión de endoglina a nivel transcripcional<sup>434</sup>.

También se ha demostrado que la expresión de endoglina se encuentra incrementada en células endoteliales de vena umbilical humana infectadas con adenovirus recombinantes portadores de una forma activa de activin receptor-like kinasa (ALK)-1<sup>435</sup>. El ALK-1 es un receptor TGF- $\beta$ 1 cuya haploinsuficiencia se asocia con telangiectasia hemorrágica tipo 2. Se ha sugerido que ALK-1 y CD105 pueden cooperar en la regulación de la unión de la superfamilia de ligandos TGF- $\beta$ , y que ambas moléculas están involucradas en el mantenimiento de la integridad de la pared vascular<sup>435</sup>.

De forma similar, el patrón de expresión del CD105 en el desarrollo inicial de ratones está asociado con vasculogénesis y angiogénesis. En la embriogénesis de ratones, la endoglina fue detectada entre el 7.5 y 8.5 días de gestación en las células endoteliales del saco folicular, aorta dorsal y tubo cardiaco primitivo, así como en células endoteliales de todas las estructuras vasculares entre los días 9.5 y 13.5 de gestación<sup>436</sup>. En la embriogénesis humana, el CD105 se encontró exclusivamente expresado en endotelio vascular a las 4-8 semanas de gestación, y transitoriamente sobreexpresado durante la septación cardiaca y formación valvular<sup>412</sup>.

Como dato adicional para confirmar el papel funcional del CD105 en la angiogénesis humana, se ha objetivado que el anticuerpo monoclonal anti-CD105 TEC-11 inhibe de forma significativa la proliferación de cultivos de células endoteliales micro y macrovasculares<sup>437</sup>.

Diversos estudios han definido el papel del CD105 como un poderoso marcador para cuantificar densidad microvascular intratumoral en tumores sólidos y hematopoyéticos, incluido la mama<sup>438</sup>, próstata<sup>423</sup>, cuello uterino<sup>439</sup>, colorectal<sup>440</sup>, y cáncer de pulmón no oat-cell<sup>441</sup>, así como en mieloma múltiple<sup>442</sup> y en determinados tipos de leucemia<sup>443</sup>. Incluso, en el cáncer de pulmón no oat-cell se ha demostrado correlación significativa entre niveles



elevados de angiopoyetina-2 (un antagonista de la angiopoyetina-1) y densidad microvascular intratumoral, mediante tinción inmunohistoquímica contra CD105. En estos tumores angiopoyetina-2 positivos, la expresión de CD105 y la densidad microvascular intratumoral se encuentran incrementados cuando los niveles de expresión de VEGF son altos<sup>444</sup>. Además, un estudio retrospectivo sobre 237 pacientes de cáncer de pulmón no oat-cell (estadios I-IIIa) demostró un índice mayor de apoptosis en los casos con menor densidad microvascular intratumoral, mediante tinción con CD105<sup>445</sup>.

Durante estadios progresivos de carcinogénesis colorectal se encontró un incremento de la densidad de microvasos teñidos con CD105, lo que se interpreta como si la cuantificación de la neovascularización, determinada por el CD105, puede representar un marcador predictor del desarrollo del cáncer colorectal<sup>440</sup>. Más evidencias de que la endoglina se encuentra involucrada en el desarrollo tumoral provienen del hallazgo de que representa un marcador de diferenciación de las células del coriocarcinoma humano. De hecho, el tratamiento del coriocarcinoma con metotrexate, un antagonista del ácido fólico, induce su diferenciación morfológica hacia células sincitiotrofoblasto-like no proliferativas, en asociación con niveles elevados de CD105<sup>446</sup>.

Recientemente, se ha encontrado que la endoglina desempeña un papel en la regulación de la adhesión, motilidad e invasión de las células prostáticas normales y degeneradas<sup>447</sup>. Se comprobó que la pérdida del CD105 en células cancerosas de próstata favorecía el desarrollo de metástasis.

En conjunto, estas evidencias científicas pueden explicar las discrepancias observadas en la actividad angiogénica del TGF- $\beta$ 1 in vivo<sup>448,449</sup> e in vitro<sup>450</sup>, y confirman el papel relevante del CD105 en el proceso angiogénico. De hecho, estos estudios indican que diferentes niveles de expresión de CD105 contribuyen a la compleja regulación de la respuesta celular del TGF- $\beta$ 1, y sugieren que el desarrollo de una respuesta angiogénica puede depender directamente del balance obtenido entre niveles de estimulación de TGF- $\beta$  y expresión de CD105<sup>399</sup>.

## Implicaciones clínicas

La angiogénesis es un proceso complejo que determina la neoformación de vasos sanguíneos a partir de brotes de microvasos pre-existentes, y afecta a otros procesos como la remodelación de la matriz extracelular, proliferación y migración de células endoteliales. Parece claramente establecido que la progresión tumoral es un fenómeno dependiente de la angiogénesis, tanto en el crecimiento del tumor primario como en su diseminación metastásica<sup>451,452</sup>. A la luz de los recientes avances en el conocimiento de la distribución tisular y función del CD105, comienza a ser más que evidente su implicación en el mecanismo de la angiogénesis, y por tanto se está desarrollando un creciente interés para su potencial utilización como marcador de neovascularización tumoral, y su significativo papel en el diagnóstico y pronóstico clínico en pacientes con cáncer.

En relación con todo esto, el CD105 se ha revelado como un excelente marcador para cuantificar la angiogénesis tumoral y como un factor predictor del pronóstico en pacientes con cáncer de mama<sup>438,453</sup>.

La cuantificación de la densidad de microvasos intratumorales mediante tinción inmunohistoquímica con CD105 es un indicador de pronóstico desfavorable en pacientes con determinados tumores sólidos como el cáncer de pulmón no oat-cell<sup>441</sup>, el cáncer de cuello uterino<sup>439</sup>, de próstata<sup>423</sup>, y de mama<sup>438</sup>. También se ha encontrado menor intensidad de tinción con CD105 en carcinomas escamosos T1 de cavidad oral en comparación con tumores T2, T3 y T4, es decir, mayor expresión de endogлина en tejido tumoral que en mucosa oral sana, con significación estadística ( $p < 0.001$ ), y mayor expresión de endogлина a medida que el tamaño tumoral aumenta<sup>454,455</sup>. Sin embargo, no se ha encontrado correlación estadística entre expresión de VEGF y tinción con endogлина en cáncer oral<sup>455</sup>.

Otro factor de controversia en carcinoma escamoso de cavidad oral viene determinado por los diferentes resultados obtenidos de la cuantificación vascular tumoral con diferentes anticuerpos<sup>456</sup>. Respecto a ello, Martone et al publican recientemente un estudio en el que cuantifican densidad microvascular



en cáncer de cabeza y cuello con CD34 y CD105 y su análisis multivariante determina que la densidad de microvasos CD105+ es el único marcador independiente de recurrencia tumoral o muerte<sup>457</sup>. Resultados similares se han obtenido en carcinomas de células basales de cabeza y cuello<sup>458</sup>.

Algunos hallazgos experimentales sugieren que la determinación de CD105 mediante anticuerpos monoclonales radiomarcados es un procedimiento seguro y prometedor para registrar tumores sólidos mediante imágenes, independientemente de su estirpe histológica y de la expresión de CD105 en células malignas<sup>425,459</sup>.

La determinación de CD105 para tratamiento de tumores sólidos ha sido validada experimentalmente en ratones; de hecho, anticuerpos monoclonales anti-CD105 radiomarcados o inmunotoxin-conjugados han demostrado alta eficacia antitumoral en ratones severamente inmunodeficientes portadores de carcinoma mamario humano, probablemente mediada por inhibición de angiogénesis tumoral y/o destrucción de vascularización tumoral<sup>460,461</sup>. En otro estudio experimental se inocularon células cancerosas de mama humanas en piel injertada humana, que contenían vasos sanguíneos humanos. Los resultados indicaron que la combinación de anticuerpos monoclonales anti-CD105 y ciclofosfamida demostró una eficacia antitumoral sinérgica, y consiguió remisiones completas tumorales<sup>462</sup>. En la interpretación de los resultados de este trabajo es interesante destacar que los anticuerpos monoclonales anti-CD105 suprimían de forma efectiva el desarrollo de vasos, aunque solamente demostraban escaso poder supresor en el crecimiento vascular de tumores de ratones.

Por otra parte, se ha demostrado que la endogлина tiene capacidad de determinar terapia génica en células endoteliales<sup>463</sup>. Además, se ha visto que un vector construido con el promotor CD105 puede ser utilizado de manera eficiente para liberar expresión génica específicamente en células endoteliales de vasos sanguíneos de ratones<sup>464</sup>. Incluso determinados fragmentos del promotor CD105 fueron utilizados para dirigir la expresión de proteínas reguladoras en cerdos, generando una expresión intensa de dichas proteínas

reguladoras en vasos del corazón, riñón y pulmones, pero no en grandes vasos<sup>465</sup>. Estas observaciones parecen reafirmar la expresión preferencial del CD105 en células endoteliales de los microvasos.

Finalmente, la relación entre radioterapia y expresión de CD105 permanece controvertida. Wang et al<sup>466</sup> demostraron en 1995 que los efectos de las radiaciones ionizantes estimulan la expresión de CD105 en la membrana de las células endoteliales de la vena umbilical humana y de tumores cerebrales. De esta forma, los pacientes neoplásicos sometidos a radioterapia que experimenten esta estimulación de la expresión de CD105 presentarían mayor intensidad de sus procesos angiogénicos. Este hallazgo de niveles incrementados de CD105 convierte a esta proteína en una diana idónea para el control de la angiogénesis, especialmente después de radioterapia en pacientes de cáncer.

#### **1.5.4. Perspectivas futuras**

Hemos visto que existen diversos estudios que sugieren que la cuantificación de microvasos intratumorales mediante tinción con CD105 y del CD105 soluble tienen significación pronóstica en determinadas neoplasias. Por su parte, la potencial utilidad de la endoglina en imagen tumoral y en terapia antiangiogénica también ha sido bien documentada utilizando diferentes modelos animales.

Estas y otras evidencias ya reseñadas parecen defender la hipótesis de que el CD105 desempeña un papel clave en la angiogénesis y que es un marcador molecular extraordinario para posibles determinaciones diagnósticas y planteamientos bioinmunoterapéuticos en neoplasias humanas<sup>467</sup>. Sin embargo, la detección de niveles variables de endoglina en la microvascularización de tejidos normales ha despertado controversias sobre las posibles aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos monoclonales anti-CD105 en pacientes con cáncer, especialmente debido a sus efectos secundarios<sup>468</sup>. Se ha apuntado que



la mayoría de las terapias basadas en anticuerpos monoclonales anti-CD105 no son específicas<sup>469</sup>.

Por tanto, estos esperanzadores resultados iniciales obtenidos de forma experimental con endoglina se encuentran en la actualidad en una situación controvertida en cuanto a sus posibilidades clínicas, aunque garantizan la realización de esfuerzos adicionales para identificar los modelos más apropiados para el empleo de la endoglina con fines diagnósticos y terapéuticos en pacientes con cáncer. En el momento actual todavía tenemos muchos aspectos que desconocemos sobre el papel funcional del CD105 y los mecanismos que regulan su interacción con el TGF- $\beta$ . Sin embargo, la información disponible demuestra que la endoglina desempeña un papel crucial en la angiogénesis, y de esta forma está implicada en la progresión tumoral. Estas evidencias nos orientan con certeza a considerar al CD105 como una diana molecular prometedora para establecer innovaciones en el diagnóstico y en estrategias terapéuticas bioinmunológicas ante neoplasias malignas.

### **1.5.5. El CD31**

Ya hemos visto que el CD105 o endoglina es una molécula que se sobreexpresa en células endoteliales con gran actividad proliferativa, lo que le confiere una elevada selectividad para la tinción de vasos tumorales neoformados. Sin embargo, los estudios de angiogénesis se iniciaron hace cuatro décadas, y han ido evolucionando con descubrimiento de otros marcadores de células endoteliales. Entre ellos destacamos, por el importante papel que desempeña en nuestra línea de investigación, el CD31, también conocido como PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1).

El CD31 es una glicoproteína integral de membrana, miembro de la superfamilia genética de inmunoglobulinas, de 130 kDa de peso molecular, que media en los procesos de adhesión célula-célula<sup>470</sup>. Esta molécula se expresa de forma generalizada en la superficie de células endoteliales adultas y embrionarias, y también se expresa débilmente en la inmensa mayoría de leucocitos periféricos, monocitos, granulocitos y plaquetas. De forma somera,

las principales líneas celulares en que se expresa el CD31 se consideran en actualidad las siguientes<sup>407,470-472</sup>:

- Expresión en células endoteliales, plaquetas, leucocitos, y sus precursores.
- Expresión a altos niveles en todo endotelio continuo; concentrado en uniones entre células endoteliales in vitro
- Expresión difusa en monocitos, neutrófilos, y células NK.
- Expresión en acúmulos de células T, no en células B circulantes

Merced a estas propiedades, se ha demostrado su participación en procesos tales como reacciones inflamatorias, cicatrización de heridas y desarrollo temprano cardiovascular<sup>471</sup>. Múltiples procesos de interacción célula-célula entre células endoteliales, y entre éstas y otras estirpes celulares, han sido descritos en la literatura. Con ello, se ha demostrado su papel regulador en la angiogénesis<sup>473-475</sup>.

En la actualidad se considera un marcador de angiogénesis, superior a otros como el CD34. De hecho se ha venido utilizando en los últimos años como medidor de angiogénesis, y numerosos estudios se han basado en las tinciones con CD31 para cuantificar densidades vasculares<sup>334,337,343,344,476</sup>.



# **CAPITULO II**

## **JUSTIFICACION Y**

## **OBJETIVOS**

El carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, a pesar de los continuos avances de la ciencia médica, persiste en la actualidad como una enfermedad de muy difícil tratamiento. La inexplicable variación de comportamiento clínico de unos tumores a otros, la teoría de la cancerificación de campo, la complejidad genética de las transformaciones neoplásicas y su variabilidad en cuanto a expresividad o penetrancia, no sólo según la estirpe tumoral, sino incluso en tumores de la misma estirpe e idéntica localización, nos revela que estamos ante una enfermedad muy compleja. El cáncer es algo más que una masa celular de crecimiento autónomo; es un proceso patológico progresivo, de consecuencias letales, y como tal se debe tratar con radicalidad y de forma agresiva. Esta agresividad terapéutica no se refiere sólo a nivel macroscópico mediante la resección de la masa tumoral primaria con unos márgenes de radicalidad, y la eliminación de los implantes metastáticos locoregionales, sino también debe ser abordado a nivel microscópico. Los avances más recientes y esperanzadores en Oncología, incluyendo obviamente la oncología de cabeza y cuello, se refieren al campo de la terapia génica, al hecho de que es básico el control del proceso tumoral a nivel molecular, que es al nivel que se producen las disregulaciones que ponen en marcha y perpetúan la enfermedad. Estas premisas orientan las esperanzas de futuro del tratamiento del cáncer en métodos como la terapia génica, y combinaciones de quimioterapia y radioterapia en asociación con la misma. Además, el sacrificio que supone el tratamiento quirúrgico de cabeza y cuello en lo que respecta a estética y a funciones primordiales para la vida de relación, imponen la necesidad de buscar alternativas terapéuticas más conservadoras que la cirugía.

En el tratamiento del cáncer de lengua, el menoscabo de funciones básicas como son la masticación, la deglución o la fonación, se ve agravado por la asociación de trastornos de autoestima en los pacientes, con importante afectación de sus relaciones interpersonales, profesionales y sociales. Todo ello



genera una situación de deterioro psicológico en un porcentaje importante de pacientes que nos lleva a buscar alternativas terapéuticas de forma multidisciplinaria.

Por otra parte, y a pesar de los años y los esfuerzos investigadores que se han invertido, la cirugía continúa siendo la piedra angular del tratamiento del cáncer de cavidad oral y orofaringe. Hoy en día, el tratamiento quirúrgico persiste como la alternativa terapéutica que ofrece mejores resultados en cuanto a supervivencia en estos pacientes, y todavía constituye la referencia con la que se comparan el resto de los tratamientos para valorar sus resultados. Además, no se debe olvidar que la cirugía es un arma terapéutica de más de un uso, a diferencia de otras como la radioterapia, cuyo empleo restringe las posibilidades de tratamiento en caso de recidivas tumorales o de aparición de segundos tumores primarios de forma metacrónica. Por su parte, la incesante progresión en los últimos años de las técnicas de reconstrucción, basada especialmente en el desarrollo de la microcirugía, no sólo mejora ostensiblemente la función tras la resección oncológica, con reconstrucciones más anatómicas y fisiológicas, sino la posibilidad de llevar a cabo resecciones más amplias, con mayores márgenes de seguridad, dada la posibilidad de cerrar defectos oncológicos cada vez más amplios. Por último, en multitud de ocasiones, las opciones terapéuticas no quirúrgicas no están exentas de complicaciones y de secuelas en los pacientes, incluso en muchos casos con un deterioro de la calidad de vida de los pacientes mayor que el que supone la agresión de la cirugía. En el caso de la lengua, en la práctica asistencial encontramos muchos casos de mayor morbilidad asociada a la radioterapia que a una resección quirúrgica.

La experiencia dicta que en el tratamiento de nuestros pacientes con tumores de lengua, al igual que acontece en otras localizaciones de cabeza y cuello, el desenlace no es siempre igual en pacientes con tumores en idéntico estadio TNM, nuestra actual referencia para la clasificación y orientación pronóstica del cáncer. Es evidente la heterogeneidad de estos procesos. Resulta llamativa la inexplicable agresividad de algunos tumores pequeños, que

no necesitan mucho tiempo de evolución antes de desarrollar metástasis. Otros, por el contrario, pueden desarrollarse durante largos periodos de tiempo, alcanzando gran tamaño localmente, sin que aparezcan metástasis regionales o a distancia. La identificación de estos grupos y de los factores que los condicionan son elementos claves a la hora de emplear unos u otros recursos terapéuticos disponibles: la adecuación del margen de resección quirúrgico, la agresividad terapéutica a nivel del cuello, la administración de radioterapia complementaria, o la elección de una técnica reconstructiva u otra. El conocimiento previo de aquellos factores que pronosticarán un desenlace mejor o peor proporcionaría una información de incalculable valor a la hora de tomar una decisión terapéutica u otra en cada paciente.

Y no se debe olvidar que nuestros recursos no son suficientes en muchas ocasiones, y la abstención terapéutica es una opción a ofrecer a nuestros pacientes y sus familias cuando las posibilidades de curación o de una mínima calidad de vida son nulas o prácticamente nulas. El conocimiento de factores que identifiquen previamente este grupo de pacientes también está justificado.

De todo este razonamiento surge la necesidad de investigar todo factor que pueda condicionar el pronóstico del cáncer de lengua, o de cualquier otra localización de cabeza y cuello. El dominio de la información de estos factores pronósticos permitiría una adecuada selección de los pacientes, y del tipo de tratamiento o de combinaciones terapéuticas óptimas para cada paciente, y ello de forma individualizada.

A pesar de que los factores actualmente aceptados son los contemplados en la clasificación TNM de la American Joint Committee on Cancer, publicada por última vez en su sexta edición en el año 2002, continúa siendo evidente la heterogeneidad de los grupos propuestos en la clasificación por estadíos, como ya se ha comentado previamente.

Partiendo de la base de que el tumor primario es el foco inicial de la enfermedad de donde partieron las células que desarrollaron las metástasis, nos proponemos en el presente estudio la investigación de uno de los factores derivados propiamente del tumor como es su capacidad intrínseca de generar la



neoformación de vasos sanguíneos a su alrededor. Esto supone la obtención de parámetros vasculares del tumor primario y correlacionar éstos con la extensión del proceso, índice de recidivas locales así como el pronóstico vital.

Tradicionalmente se reconoce que el factor pronóstico más relevante en cáncer oral es la diseminación cervical. Sin embargo, es evidente que no es el único factor implicado, y que el carácter multifactorial del pronóstico tumoral ofrece pocas dudas en la actualidad.

Los factores pronósticos más estudiados son los anatomopatológicos, como infiltración microvascular, perineural o linfática, cuya presencia identifica tumores más agresivos. Estos parámetros son aceptados actualmente por muchos autores, para los que son determinantes a la hora de tomar decisiones. Como hemos visto en capítulos anteriores, desde hace algunos años están cobrando cada vez más importancia parámetros obtenidos de estudios de genética y biología molecular del cáncer, aunque todavía sin el nivel de significación necesario para condicionar actitudes terapéuticas<sup>477</sup>.

Por su parte, para los clínicos resulta esencial determinar la respuesta terapéutica de la enfermedad con los diferentes tratamientos disponibles. El manejo de cada caso debe ajustarse a protocolos internacionalmente aceptados, pero sin olvidar su adaptación a las características individuales de cada paciente. En el caso del cáncer de lengua, resulta imprescindible predecir en la medida de nuestras posibilidades la posible respuesta de la enfermedad ante tratamientos complementarios. Si los biomarcadores cuantificados en la pieza histológica de una biopsia diagnóstica nos pudieran predecir la respuesta terapéutica, constituiría una gran ayuda para establecer un plan quirúrgico para nuestros pacientes. Más aún, podrían llegar a proporcionar una información de incalculable valor para determinar la respuesta a radioterapia y/o quimioterapia.

En este trabajo, hemos intentado adaptar toda esta información al proceso neoangiogénico asociado al desarrollo del carcinoma epidermoide de lengua. Y nos hemos centrado en el fenómeno de la angiogénesis basándonos en que la revisión de la escasa literatura existente nos parece de gran interés clínico. Para un cirujano oncológico, el desarrollo de la masa tumoral y su

crecimiento hacia tejidos vecinos y diseminación a distancia constituye la llave maestra para entender su trabajo en el quirófano. Hasta la fecha, la información de que disponemos es escasa, las series analizadas son cortas, y no existen trabajos específicos en esta región anatómica. Y ello a pesar de la creciente incidencia del cáncer oral, en comparación con neoplasias de otras localizaciones que, curiosamente, han estudiado ampliamente el proceso angiogénico asociado, e incluso esa información ha sido incorporada a protocolos internacionales sobre toma de decisiones clínicas.

Con todo lo expuesto, el **objetivo fundamental** del presente trabajo es la búsqueda de nuevos parámetros cuantificables que tengan una significación relevante en el comportamiento clínico de los carcinomas epidermoides de lengua, y de esta forma nos supongan una información sobre la evolución pronóstica de cada caso.

Los *objetivos concretos* de este trabajo se podrían enumerar de la siguiente forma:

1. Incrementar nuestro conocimiento sobre el carcinoma epidermoide de lengua, y su actual significado sanitario en nuestro medio.

2. Obtener más información sobre el proceso de la angiogénesis, en concreto de la angiogénesis tumoral aplicada al carcinoma epidermoide de lengua.

3. Conocer los parámetros que intervienen en el proceso angiogénico y su influencia en el mismo.

4. Determinar el papel de la endogлина (CD105) y del CD31 en la angiogénesis del carcinoma epidermoide de lengua, y su potencial significación en la evolución del mismo, su capacidad de diseminación y/o de enviar metástasis sistémicas, su respuesta a las diferentes terapias disponibles, y, en resumen, su valor en el pronóstico global del paciente.

5. Acúmulo de experiencia y desarrollo de un método de cuantificación objetivo de la angiogénesis tumoral.

6. Comprobar si la endogлина es efectivamente un método objetivo de cuantificación de la angiogénesis en el carcinoma epidermoide de lengua, y si



puede llegar a suponer un método fiable para determinar y/o predecir la respuesta terapéutica del paciente.

7. Estudiar la capacidad del carcinoma epidermoide de lengua para reclutar vasos sanguíneos existentes en la periferia del tumor que le ayuden a progresar, infiltrar tejidos vecinos y migrar a distancia.

## **Diseño general del estudio: Justificación**

Para este proyecto se ha optado por analizar retrospectivamente una cohorte histórica de pacientes con afectación del órgano lingual por carcinoma epidermoide. En la literatura médica se encuentran diversos estudios sobre el papel de la angiogénesis en el cáncer de cabeza y cuello, e incluso de forma más concreta en el cáncer de cavidad oral. Sin embargo, como hemos visto previamente en el presente trabajo, la revisión de dichos estudios proporciona resultados contradictorios.

Por su parte, ya hemos mencionado que una de las variables atribuidas en la literatura a esta contrariedad de resultados viene determinada por la diferente vascularización existente entre diferentes regiones de la cavidad oral<sup>343</sup>. Por ello, hemos limitado el estudio a una sola región, y quizás la más representativa en cáncer de cavidad oral, como es la lengua. Y ello aún a sabiendas de que reduce significativamente el tamaño muestral.

Con todo esto, a pesar de las limitaciones, hemos decidido abrir una línea de investigación en cáncer de lengua consistente en un análisis de la angiogénesis, cuantificada mediante tinción con CD105 y con PECAM-1/CD31 (Platelet endotelial cell adhesion molecule-1), y estudio de su papel como factor pronóstico. Dado que el CD31, al ser un marcador pan-endotelial, es un marcador inespecífico de angiogénesis, y que el CD105 es un marcador sobreexpresado en células endoteliales altamente proliferativas, como son células endoteliales de una masa tumoral, la cuantificación diferencial de una muestra con ambos marcadores nos indicará qué proporción de la densidad

vascular en la masa tumoral corresponde al tejido en sí (angiogénesis no tumoral), y qué proporción de vasos sanguíneos son recientemente generados por la masa tumoral para su progresión (angiogénesis tumoral). De esta forma, pretendemos obtener resultados más clarificadores a la hora de evaluar el papel de la angiogénesis en el desarrollo y progresión del carcinoma epidermoide de lengua. Además, intentamos determinar si la densidad vascular intratumoral y peritumoral puede ser un factor predictivo de la respuesta terapéutica del tumor, en concreto a la radioterapia.

La comparación de los resultados con tinción con CD31 y con CD105 respecto a los resultados obtenidos con el conteo diferencial con CD31-CD105 nos permite discernir si un parámetro obtenido para una tinción específica de angiogénesis tumoral viene determinado por la capacidad del tumor de desarrollar neovasos tumorales o por la capacidad del tumor para reclutar vasos preformados de la periferia del tumor.

Para nuestro estudio, en primer lugar es preciso valorar si la cuantificación de la densidad de vasos realizada con un conteo de CD105 y CD31 en el estudio histológico tiene relación con la historia clínica tumoral. Es decir, si los carcinomas con peor pronóstico y que han experimentado peor evolución clínica tienen una mayor cantidad de vasos.

En segundo lugar hay que intentar relacionar el conteo vascular diferencial con el pronóstico del carcinoma epidermoide de lengua. Nuestro estudio pretende valorar de forma retrospectiva la expresión de endoglin en las muestras histológicas de estos carcinomas en relación con el pronóstico de los mismos tras un mínimo de 8 años de seguimiento.

En tercer lugar, se pretende relacionar la densidad vascular peritumoral y neoangiogénica con la respuesta del carcinoma epidermoide de lengua a la radioterapia complementaria.



# **CAPITULO III**

## **MATERIAL Y METODOS**

## **3.1. MATERIAL: DATOS GENERALES**

### **3.1.1. Descripción de la muestra**

#### **Descripción general del estudio**

Se estudiaron los carcinomas epidermoides que afectaban tejido lingual analizados en el Servicio de Anatomía Patológica del CHU Juan Canalejo entre los años 1993 y 1996. Se obtuvieron también los datos clínicos de todos estos enfermos haciendo especial énfasis en la supervivencia, tratamiento y evolución del proceso. Cerrar el estudio en 1996 permite valoraciones como mínimo de 8 años de seguimiento.

Antes de iniciar la revisión retrospectiva de los datos clínicos, se planteó la posibilidad de realizar un cálculo estadístico del tamaño muestral. Sin embargo, se desechó tal posibilidad en base a la ausencia de estudios similares en la literatura, que impedían obtener datos sobre una aproximación a los resultados pronósticos que se pretendiera determinar como hipótesis de trabajo.

En primer lugar se realizó un estudio estadístico descriptivo de la muestra, determinando parámetros como edad, sexo, hábitos de tabaco y alcohol, localización primaria del tumor, estadiaje TNM, procedimiento quirúrgico sobre la lesión primaria, tratamiento del cuello, y radioterapia complementaria. Se estudió la presencia de recidiva y su localización, así como el tratamiento de la misma. Para valorar la evolución clínica y establecer comparativas respecto a factores pronóstico se estudió el periodo libre de enfermedad de los elementos de la muestra, la supervivencia global, y la existencia o no de éxitos.

Posteriormente se realizó una tinción con CD31 y con CD105 ó endoglina en el tejido tumoral para determinar el número de vasos en las muestras histológicas de todos los pacientes, obtenidas del banco de muestras del Departamento de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Juan Canalejo.



Se intentó realizar una comparación estadística entre esta densidad de microvasos y el estadiaje tumoral para ver si se encuentra significación estadística en la relación entre expresión de CD31 y endoglina, y estadiaje tumoral. Sin embargo, el reducido tamaño de la muestra impidió un análisis estadístico exhaustivo debido a que la estratificación por estadios de la muestra de casos teñidos determinaba submuestras con muy pocos casos en varios estadios.

Posteriormente, obteniendo los datos clínicos sobre evolución de los pacientes, tratamientos realizados y supervivencia, se consideró realizar una correlación estadística entre la densidad de microvasos y la supervivencia del paciente, tanto global como libre de enfermedad. Se analizó la relación entre el conteo y la aparición de recidivas. Con todo ello podemos valorar la significación pronóstica global de la angiogénesis en el carcinoma epidermoide de lengua.

Para valorar el papel de la endoglina como factor predictivo de la respuesta terapéutica tumoral a la radioterapia se seleccionaron los casos radiados de la muestra y se estudió su supervivencia y la presencia de recidivas de forma descriptiva. Seguidamente se realizaron los mismos estudios comparativos de medias entre conteo vascular con CD31 y con endoglina a diferentes aumentos y las cifras de supervivencia, recidiva y tiempo de supervivencia y libre de enfermedad.

### **Criterios específicos de inclusión en el estudio**

- Pacientes con carcinoma epidermoide situado primariamente o con afectación de tejido lingual.
- Datos epidemiológicos completos.
- Información completa sobre tratamientos realizados y evolución pronóstica.
- Seguimiento evolutivo del proceso superior a 5 años.
- Pacientes intervenidos quirúrgicamente de su enfermedad neoplásica.
- Disponibilidad de muestra histológica del carcinoma epidermoide.

**Criterios de exclusión de la muestra**

- Pacientes con tumoraciones linguales que no sean carcinoma epidermoide.
- Información incompleta sobre hábitos tóxicos, edad, tratamientos realizados y/o evolución pronóstica de su enfermedad.
- Información inferior a 5 años de evolución del proceso.
- Pacientes que no hayan recibido tratamiento quirúrgico de su enfermedad.
- Muestra histológica no disponible en condiciones adecuadas para llevar a cabo las tinciones.
- Pacientes con tratamientos o condiciones previas que pudieran alterar el patrón angiogénico de la tumoración: radioterapia y/o quimioterapia preoperatorio, patología angiogénica, etc.

**Plantilla de recogida de datos**

La plantilla utilizada para la recogida de datos ha sido la siguiente:



## Ca. Lengua - Angiogénesis

1. NHC:
2. Nombre:
3. Teléfono:
4. Sexo:      V (1)                      M (2)
5. Fecha nacimiento:
6. Tabaco      Sí (1)                      No (2)
7. Alcohol      Sí (1)                      No (2)
8. Tumor primario  

Lengua móvil (1)
Base lengua (2)
Lengua ampliada (3)
9. TNM  

T1 (1)
T2 (2)
T3 (3)
T4 (4)
10.      N0 (1)              N1 (2)              N2a (3)              N2b (4)              N2c (5)              N3 (6)
11. Fecha cirugía:
12. Procedimiento quirúrgico:  

(1) Glossectomía parcial  
(2) Hemiglossectomía  
(3) Glossectomía subtotal  
(4) Glossectomía total  
(5) Glossectomía ampliada  
(6) Laringoglossectomía  
(7) Otras
13. Vaciamiento cervical derecho  

(1) No                      (2) Funcional                      (3) Radical
14. Vaciamiento cervical izquierdo  

(1) No                      (2) Funcional                      (3) Radical
15. Radioterapia postoperatoria:      (1) Sí                      (2) No
16. Recidiva:                      (1) Sí                      (2) No
17. Localización recidiva:  

(0) No              (1) Local                      (2) Regional                      (3) Distancia
18. Tratamiento recidiva:  

(0) No                      (1) Paliativo                      (2) Curativo
19. Tipo de tratamiento de recidiva  

(0) No              (1) Cirugía                      (2) Radioterapia                      (3) Quimioterapia
20. Tiempo libre de enfermedad:                      meses.
21. Supervivencia global:                      meses.
22. Fallecimiento:                      (1) Sí                      (2) No

23. Observaciones

### 3.1.2. Cohorte de pacientes

Inicialmente se seleccionaron 55 pacientes intervenidos en el Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo de La Coruña durante los años 1993 a 1996, y que cumplían los criterios de inclusión en el estudio. Se recogieron datos de forma retrospectiva del historial clínico de los pacientes seleccionados, y se realizó un control de su estado en Abril de 2004, momento en el que se censuran los casos que todavía sobreviven.

Se recogieron tallados de las piezas anatomopatológicas correspondientes. Estos tallados correspondieron a áreas de afectación lingual por carcinoma epidermoide.

Por alteración de las muestras histológicas o de la técnica de tallado se procedieron a rechazar 12 casos. De esta manera la cohorte final de pacientes del estudio fue de **43 casos**.

De los 43 pacientes, se dispone de los datos de la historia clínica y la exploración, anatomía patológica, tratamientos complementarios y seguimiento clínico, hasta Abril de 2004, momento en que se efectúa el estudio de corte de la serie.

En la tabla 4 se describen los principales datos correspondientes a la muestra de 43 pacientes incluidos en el estudio.



Id	Sexo	Edad	Tabaco	Alcohol	Tumor primario	pT	pN	VCdcho	VCizqdo	RDTpost	Recidiva	Superv	Exitus
1	V	66	Sí	Sí	Base lengua	T1	N0	No	No	No	No	119	No
2	V	66	Sí	Sí	Lengua móvil	T2	N2c	Func	Func	No	Sí	35	Sí
3	M	74	No	No	Lengua móvil	T1	N2b	No	Func	No	No	113	No
4	V	59	Sí	Sí	Lengua móvil	T2	N2b	No	Func	Sí	Sí	9	Sí
5	M	70	No	No	Lengua ampliada	T4	N0	No	Func	Sí	Sí	4	Sí
6	V	40	Sí	Sí	Lengua ampliada	T2	N2b	Func	Func	No	Sí	119	No
7	M	78	No	No	Lengua ampliada	T2	N0	Func	No	No	No	114	No
8	V	77	Sí	Sí	Lengua ampliada	T4	N1	No	Func	Sí	Sí	115	Sí
9	V	64	Sí	Sí	Lengua móvil	T2	N0	Func	No	Sí	Sí	57	Sí
10	V	72	No	No	Lengua móvil	T1	N0	Func	Func	No	No	98	No
11	V	53	Sí	Sí	Base lengua	T2	N0	No	Func	No	Sí	26	Sí
12	V	70	Sí	Sí	Base lengua	T2	N2b	Func	No	Sí	Sí	98	No
13	V	66	Sí	Sí	Lengua ampliada	T4	N0	No	Func	Sí	Sí	19	Sí
14	V	65	Sí	Sí	Lengua móvil	T2	N0	Func	No	Sí	Sí	19	Sí
15	V	60	Sí	Sí	Lengua ampliada	T4	N0	Func	No	Sí	No	112	No
16	M	83	Sí	Sí	Lengua ampliada	T3	N1	No	Radical	Sí	Sí	4	Sí
17	V	78	Sí	Sí	Lengua ampliada	T2	N2b	No	Func	No	Sí	11	Sí
18	V	40	Sí	Sí	Base lengua	T2	N2b	Func	No	Sí	Sí	112	No
19	V	60	Sí	Sí	Base lengua	T1	N0	No	Func	No	Sí	82	Sí
20	V	52	Sí	Sí	Base lengua	T4	N3	Func	Func	Sí	Sí	9	Sí
21	V	64	Sí	Sí	Lengua ampliada	T3	N0	Func	Func	Sí	Sí	125	No
22	V	56	Sí	Sí	Base lengua	T2	N2b	Func	Func	Sí	Sí	14	Sí
23	V	48	Sí	Sí	Base lengua	T2	N2b	Func	No	Sí	Sí	12	Sí
24	V	46	Sí	Sí	Lengua ampliada	T2	N0	No	Func	Sí	Sí	28	Sí
25	V	65	Sí	Sí	Lengua ampliada	T4	N2b	Func	Func	Sí	Sí	44	Sí
26	V	76	Sí	Sí	Lengua ampliada	T3	N0	No	Func	Sí	Sí	43	Sí
27	V	72	Sí	No	Base lengua	T4	N0	Func	No	No	Sí	35	Sí
28	V	54	Sí	Sí	Base lengua	T3	N0	No	Func	Sí	Sí	107	No
29	V	77	Sí	Sí	Lengua móvil	T2	N0	Func	No	No	No	106	No
30	V	46	Sí	Sí	Lengua móvil	T1	N3	Radical	Func	Sí	Sí	105	No
31	V	72	Sí	Sí	Lengua ampliada	T1	N2b	Func	Func	Sí	Sí	19	Sí
32	V	59	Sí	Sí	Lengua ampliada	T1	N2c	Func	Func	Sí	Sí	14	Sí
33	V	48	Sí	Sí	Lengua ampliada	T1	N0	Func	Func	No	No	103	No
34	V	56	Sí	Sí	Base lengua	T2	N2b	No	Func	Sí	Sí	79	Sí
35	M	53	No	No	Lengua ampliada	T4	N0	No	Func	No	Sí	14	Sí
36	M	71	No	No	Lengua ampliada	T2	N0	No	Func	No	Sí	131	No
37	M	62	No	No	Lengua móvil	T2	N0	No	Func	Sí	Sí	96	Sí
38	V	56	Sí	Sí	Base lengua	T2	N0	No	Func	No	Sí	39	Sí
39	V	57	Sí	Sí	Lengua móvil	T2	N0	Func	No	No	Sí	53	Sí
40	V	48	Sí	Sí	Base lengua	T4	N2c	Func	Radical	Sí	No	99	No
41	V	68	Sí	Sí	Lengua ampliada	T2	N0	Func	No	No	Sí	99	Sí
42	V	48	Sí	Sí	Lengua móvil	T3	N2a	Func	Func	Sí	Sí	7	Sí
43	V	52	Sí	Sí	Lengua ampliada	T4	N2b	Func	No	Sí	Sí	39	Sí

V = Varón; M = Mujer; VCdcho = Vaciamiento cervical derecho; VCizqdo = Vaciamiento cervical izquierdo; Func = Funcional.  
La supervivencia está cuantificada en meses.

**Tabla 4.** Datos correspondientes a los pacientes de la muestra.

### **3.1.3. Estudio anatomopatológico**

Se recogió el resultado histológico proporcionado por el servicio de Anatomía Patológica después de la intervención quirúrgica, para la valoración del pronóstico y determinación de la necesidad de realizar tratamientos complementarios para el control de la enfermedad. De todas formas se realizó una reevaluación por un patólogo, que realizó nuevos tallados de la pieza macroscópica y estudio histológico convencional mediante tinción con hematoxilina-eosina. Al mismo tiempo se realizó el estudio inmunohistoquímico mediante conteo vascular en campos microscópicos de gran aumento (de x100 y x400 aumentos) a las muestras histológicas con tinción con anticuerpos anti-CD31 y anti-CD105.



## 3.2. DESCRIPCION DEL ESTUDIO

Los aspectos generales del estudio ya han sido descritos en apartados anteriores. En este apartado se describirá el método de cuantificación de la angiogénesis tumoral y la realización del conteo vascular.

### 3.2.1. Cuantificación de la angiogénesis tumoral

Las células endoteliales proliferativas en la neovasculatura tumoral se comportan de forma diferente a las células endoteliales normalmente inactivas con respecto a sus características morfológicas, metabolismo, regulación genética, bioquímica y características inmunológicas. En este concepto se basan las diferentes estrategias que se han investigado para cuantificar la angiogénesis tumoral. De esta forma, determinando los marcadores diana de las células endoteliales de los neovasos tumorales estaríamos capacitados no sólo para su identificación y cuantificación, sino también para modificar su regulación con fines terapéuticos. El marcador ideal de neoendotelio tumoral sería aquel que estuviera (1) sobreexpresado en endotelio proliferante pero no en endotelio normal, y (2) localizado en grandes cantidades en áreas de fácil identificación, como en la superficie luminal vascular, de esta forma fácilmente accesible a su reconocimiento mediante diferentes técnicas<sup>459</sup>.

En primer lugar, para estudiar la angiogénesis en tejidos tumorales mediante la tecnología actual es necesario obtener tejido suficiente para examen histológico del mismo. El criterio estándar para este examen histológico de piezas tumorales consiste en destacar el endotelio tumoral mediante anticuerpos que diferencien las células endoteliales de otras estirpes celulares del tumor. El primer anticuerpo utilizado fue el factor VIII-RA (FVIII-RA), y éste es todavía el anticuerpo utilizado en muchos de los estudios publicados<sup>341</sup>. Otros anticuerpos específicos de las células endoteliales que se han utilizado en estudios de angiogénesis tumoral son el CD31/PECAM, el CD34, CD36, TEC-11,

y el ulex europaeus (UEA). En la actualidad, los anticuerpos más utilizados son FVIII-RA, CD31 y CD34.

La endogлина humana (CD105) es un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento transformante beta que recientemente se ha ligado a la telangiectasia hemorrágica hereditaria de tipo I, o Rendu-Osler-Weber. Expresada en pequeña cantidad en los vasos normales, aumenta mucho su expresión en procesos inflamatorios y neoplásicos. Por ello, en el contexto de la angiogénesis tumoral es considerada como un marcador de neovascularización en tejidos neoplásicos. Estudiar la vascularización tumoral a través de un marcaje diferencial con endogлина y F-VIII, CD31 ó CD34 podría proporcionarnos importante información sobre la vascularización normal y la vascularización tumoral.

La angiogénesis tumoral puede ser cuantificada mediante conteo de vasos en campo microscópico de alta magnificación una vez teñidos con anticuerpos frente a antígenos endoteliales resistentes a formalina, entre los que se incluye el antígeno factor VIII (FVIIIa) y el CD-31<sup>235,237,343,344</sup>.

Weidner et al<sup>235</sup> estudiaron los efectos de la angiogénesis en correlación con tumores de mama y realizaron la cuantificación mediante recuento de microvasos (capilares y vénulas) usando microscopio óptico y determinando la densidad de microvasos en fragmentos de la masa tumoral. Para identificar los microvasos utilizaron una tinción inmunocitoquímica de sus células endoteliales con factor VIII. Identificaron las áreas tumorales de mayor vascularización mediante microscopio de pequeños aumentos (40x y 100x). Posteriormente, contaron cuidadosamente los microvasos en campos micorscópicos de 200 y 400 aumentos, y su densidad fue graduada en una escala de 1 a 4+.

Williams et al<sup>341</sup>, en una publicación de 1994, cuantifican de forma similar la densidad vascular en tumores de cavidad oral. Empiezan seleccionando las áreas tumorales de mayor vascularización, principalmente localizadas en la periferia del tumor, mediante micoscopía de baja resolución. Las áreas teñidas inmunohistoquímicamente mediante factorVIII-RA son determinadas mediante un sistema CAS 200 (Cell Analysis System, Becton-



Dickinson Cellular Imaging Systems, San Jose, California), consistente en un microscopio óptico modificado y un ordenador compatible que proporciona vídeo-imágenes de citometría<sup>478</sup>. Este sistema requiere un campo microscópico de 400 aumentos. El análisis del ordenador se limita a 1/16 del área visualizada con el microscopio. Por tanto se requieren 15 a 20 campos analizados informáticamente para estudiar la totalidad del campo. De esta forma, se halla el área media por campo teñido con factor VIII. También estudia de forma comparativa la angiogénesis asociada al epitelio normal.

En la actualidad, la mayor parte de las publicaciones científicas que tratan el tema de la angiogénesis utilizan el método descrito por Weidner en 1998<sup>479</sup>. Weidner cuantifica la mayor densidad vascular en secciones tisulares visualizadas con un campo de magnificación de 100 aumentos en las regiones con mayor intensidad de tinción con anti-CD31. A continuación realiza un recuento de vasos incluídos dentro de un campo de 0.74 mm<sup>2</sup> a 200 aumentos. Se realizó el conteo vascular en tres campos microscópicos, y la máxima densidad vascular fue considerada como la "highest microvascular density" (h-MVD), expresada en unidades de *vasos por milímetro cuadrado*. La identificación randomizada de nidos tumorales se realizó mediante delimitación de múltiples círculos en las preparaciones previamente al examen microscópico.

### Otros métodos de cuantificar la angiogénesis

Se han descrito diversas estrategias para obtener imágenes de neovascularización tumoral, entre ellas métodos para medir parámetros anatómicos y fisiológicos como el volumen sanguíneo, el flujo sanguíneo o la permeabilidad capilar<sup>480,481</sup>.

Las técnicas de imagen se han convertido en herramientas imprescindibles tanto en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades como en las primeras fases de la investigación biomédica. Las investigaciones en torno a la angiogénesis tumoral no son una excepción, y las técnicas de imagen han aportado nuevas estrategias para su estudio y cuantificación<sup>482</sup>. Un equipo alemán acaba de presentar la última de las máquinas para *fotografiar* por

dentro el organismo. Se trata de la *Tomografía Computerizada Volumétrica (TCV)* y su objetivo es proporcionar imágenes del entramado vascular del cuerpo y observar hasta los más pequeños vasos sanguíneos que alimentan a un tumor. Por el momento, los experimentos sólo se han realizado en ratones a los que se les había injertado tumores humanos de piel. Los autores del trabajo consideran que la técnica está lista para su aplicación en investigación y esperan que en un futuro sea aplicable para evaluar la evolución del cáncer y la respuesta al tratamiento de los pacientes. Incluso podría llegar a discernir con precisión si una lesión es benigna o maligna, porque lo que caracteriza a la primera es la gran cantidad de vasos que la alimentan.

Los científicos alemanes desarrollaron un prototipo similar al TAC, que combina varias tecnologías cuyo objetivo es captar pequeñas estructuras tisulares como son los vasos sanguíneos. El nuevo método se comparó con la resonancia magnética en el estudio de la evolución del tumor de piel humano que se había implantado en ratones. Así se obtuvieron imágenes de la red de capilares completa de los animales y también de la enfermedad. Con la TCV se logró captar imágenes con una exposición de sólo 16 segundos, mientras que para la resonancia magnética fueron necesarios 28 minutos. Además de la rapidez, el nuevo método permitió ver los vasos del interior del tumor de hasta 30 micras de diámetro (30 millonésimas de metro).

A pesar de los buenos resultados obtenidos con el nuevo método, los científicos explican en sus conclusiones que su aplicación a organismos más grandes como el ser humano pasa necesariamente por una serie de mejoras técnicas.

Por otra parte, un equipo de radiólogos de la Universidad de Ohio, dirigidos por Michael Knopp, se ha centrado en el estudio por imagen del proceso de angiogénesis y de sus características fisiopatológicas. Los nuevos sistemas de resonancia magnética con la aplicación de agentes de contraste más específicos a nivel molecular aportarán nuevos datos sobre la heterogenicidad tumoral, detectarán los tumores más precozmente, y generarán información sobre pronóstico, respuesta terapéutica y extensión



tumoral, ya que se obtendrán imágenes de las micrometástasis y de los ganglios centinela. Según Hedvig Hricak, directora del Departamento de Radiología del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nueva York, las técnicas de imagen molecular son claves para detectar, diferenciar y clasificar las metástasis. Según estos y otros expertos, en los próximos años asistiremos a un avance de tal calibre en las técnicas de imagen diagnóstica que se resolverá el problema de la cuantificación de la angiogénesis.

En 2005, Erovcic et al<sup>483</sup> publican un estudio con cuantificación digital de densidad vascular y lo comparan con conteo individual en campos de 200 aumentos. Encuentran que la variabilidad del conteo repetitivo mediante ordenador se reduce de forma significativa ( $p=0.08$ ) en comparación con conteo repetitivo individual.

También dentro de las técnicas de imagen para cuantificación angiogénica podemos incluir las que se basan en la escintigrafía. Bredow et al<sup>459</sup> inyectaron anticuerpos marcados radiactivamente en venas de animales con actividad proliferativa tumoral inducida, y realizaron estudios escintigráficos dinámicos a diferentes retrasos de tiempo. Posteriormente sacrificaron los animales y obtuvieron muestras tumorales para estudio inmunohistológico y detección mediante una sonda captadora de radiación gamma. De esta forma establecieron un método mínimamente invasivo para cuantificar *in vivo* de forma directa la carga angiogénica a nivel molecular.

### **Cuantificación de la angiogénesis en nuestro estudio**

Se ha realizado una tinción de las muestras con endoglina o CD105, a diferentes diluciones. De esta forma se ha podido cuantificar el factor angiogénico tumoral en las muestras tisulares.

Los bloques histológicos representativos de cada muestra histológica, fijados en parafina, fueron recuperados y seccionados para su estudio inmunohistoquímico. Los reactivos CD105 y CD31 empleados fueron obtenidos de la casa DAKO (Carpintería, CA) y diluidos de acuerdo a las instrucciones recomendadas por la empresa distribuidora (Figura 34).



**Monoclonal  
Mouse Anti-Human  
Endoglin, CD105  
Clone: SN6h<sup>1</sup>**

Synonym/Synonyme: GP160

Immunogen: Purified GP160 from cell membrane glycoproteins of fresh non-T/non-B acute lymphoblastic leukemia cells<sup>1</sup>

Immunogène: GP160 purifié extrait de glycoprotéines à membrane cellulaire de cellules non T/non B de leucémie lymphoblastique aigüe<sup>1</sup>

Immunogen: Gereinigtes GP160 aus Zellmembran-Glykoproteinen von frischen non-T/non-B-Zellen der akuten lymphoblastischen Leukämie<sup>1</sup>

Isotype/ Isotyp: IgG<sub>1</sub>, kappa

**Code M3527**

Mouse IgG concentration mg/L: See label on vial.

**Figura 34.** Endoglina CD105 de la casa Dako utilizada en el estudio.

Las secciones histológicas fueron desparafinadas e incubadas durante 12 horas en un horno a 37°C, tratadas con peróxido de hidrógeno durante 10 minutos para deprivar la actividad peroxidasa endógena, y sometidas a microondas en tampón L citrato 10 mmol a pH 6.0 para desenmascarar los epitopos (Figura 35). Tras la liberación antigénica, las secciones fueron incubadas con anticuerpos primarios diluídos durante una hora, y posteriormente profusamente lavadas con suero salino. Posteriormente fueron incubadas con diaminobencidina sustrato peroxidasa durante 5 minutos. Finalmente fueron montadas en las platinas con medio convencional.



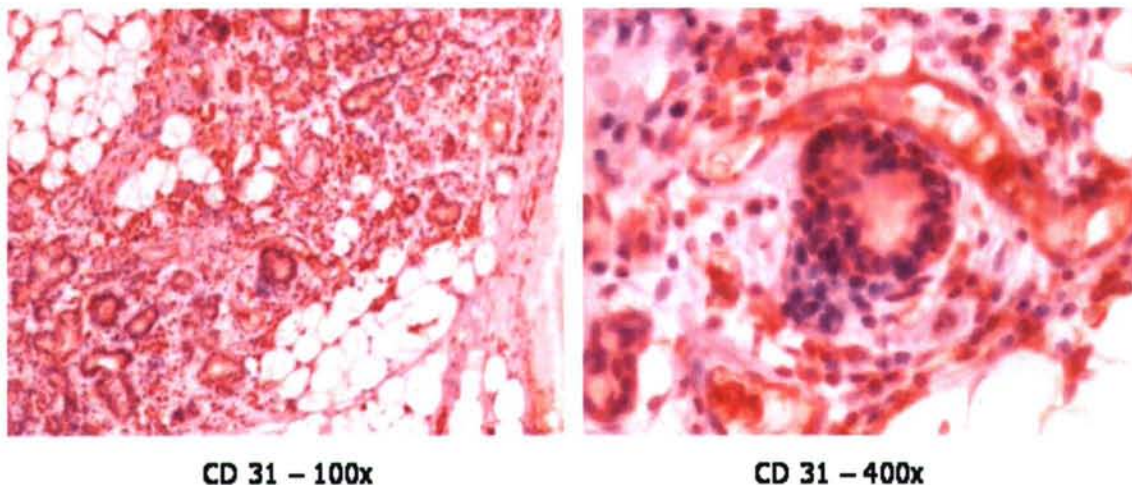


**Figura 35.** Horno empleado para el procesamiento de las muestras inmunohistológicas.

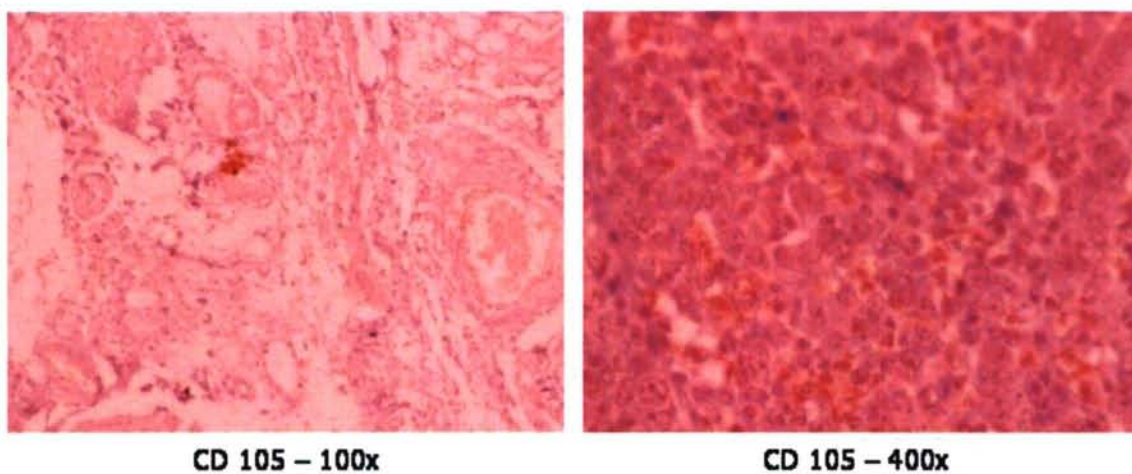
Las tinciones con CD31 se realizaron con una CSA de 1:40 y el conteo vascular al microscopio óptico se realizó con el campo de 400x. Todas las muestras teñidas fueron asimismo cuantificadas en su intensidad en una escala de 1 a 3.

Las tinciones con CD105 se realizaron con una CSA de 1:500, y los conteos al microscopio óptico se realizaron con campos de 100x y 400x. De igual forma, se cuantificó la intensidad de cada tinción en una escala de 1 a 3.

La selección de las "hot spots" se realizó con el campo de 40x, donde se localizaron las áreas de la muestra con mayor tinción.

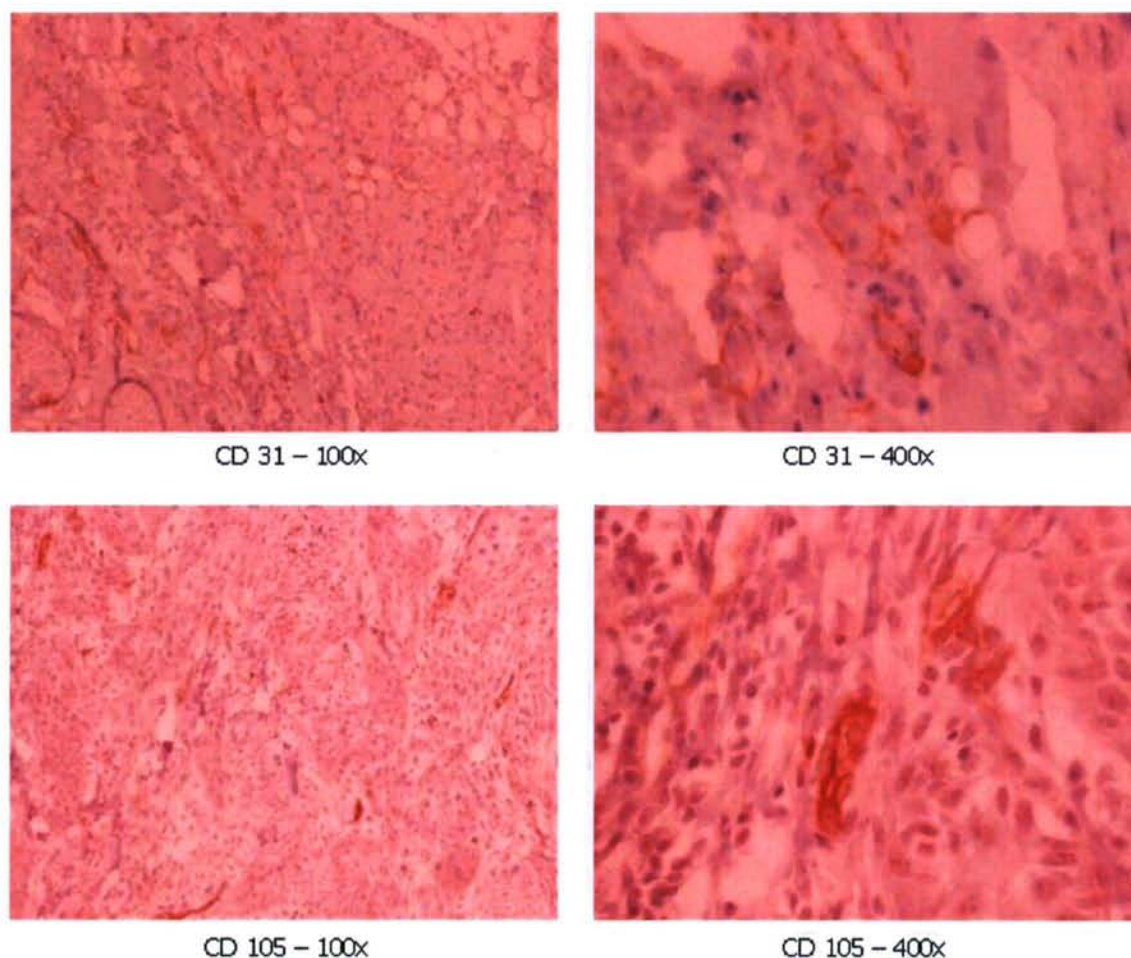


**Figura 36.** Ejemplo de tinción con CD31 en caso de carcinoma epidermoide de lengua de la muestra del estudio (Magnificación x100 y x400).



**Figura 37.** Ejemplo de tinción con CD105 en caso de carcinoma epidermoide de lengua de la muestra del estudio (Magnificación x100 y x400).





**Figura 38.** Ejemplo de tinción con CD31 y CD105 en caso de carcinoma epidermoide de lengua de la muestra del estudio (Magnificación x100 y x400).

### 3.2.2. Contaje vascular

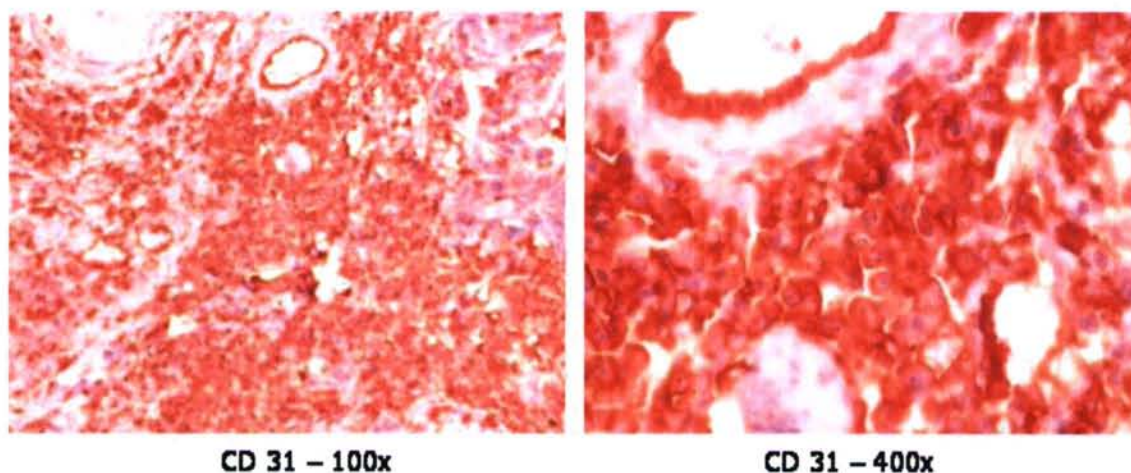
Una vez marcados los vasos con el anticuerpo correspondiente, el siguiente paso para cuantificar la angiogénesis es llevar a cabo un contaje vascular que nos permita homogeneizar el estudio. Como ya ha sido mencionado, el sistema de contaje vascular más aceptado es el propuesto por Weidner<sup>235,479</sup>, y que se basa en contaje microscópico. Otros autores han realizado el contaje mediante técnicas apoyadas en la informática<sup>341,483</sup>.

En el presente estudio nos hemos adaptado a los métodos convencionales de la mayor parte de las publicaciones relacionadas con el tema. Por tanto hemos seguido un método básicamente similar al de Weidner. Las secciones teñidas inmunohistoquímicamente fueron visualizadas en campo microscópico con magnificación de x40, para identificar las áreas de mayor

densidad vascular en la masa tumoral, es decir, los "hot spots". El conteo de los vasos se realizó en el campo de máxima densidad vascular a una magnificación de x 100 y x400 (0.369 mm<sup>2</sup> por campo). Cualquier célula o grupo de células endoteliales claramente separadas de vasos adyacentes, células tumorales y otros elementos de tejido conectivo, fueron considerados como microvaso. No se requirió la presencia de luz vascular para identificar un microvaso.

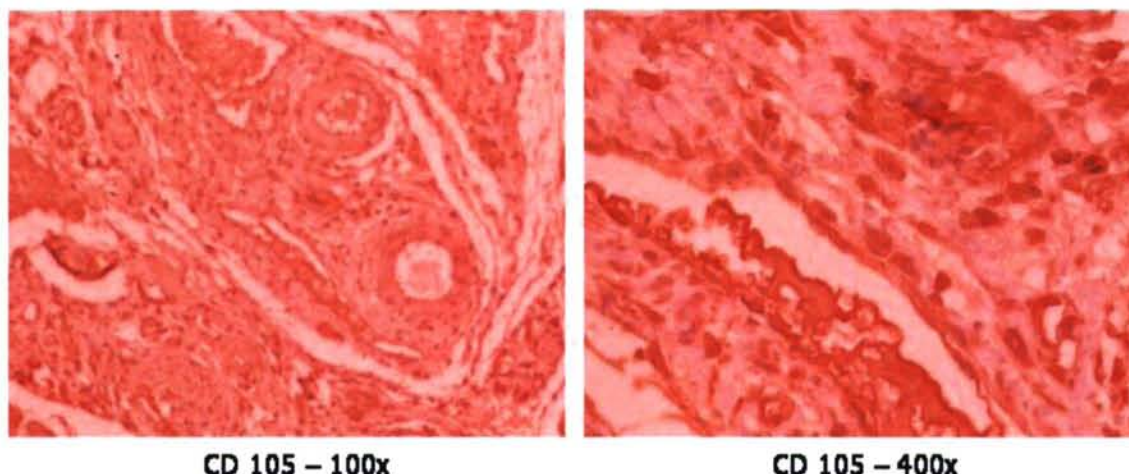
Aunque algunos autores utilizan hasta diez hot spots y la media de los datos obtenidos la consideran el conteo definitivo, no se ha demostrado que supongan un valor más fiable<sup>441</sup>. La mayor parte de las publicaciones determinan que el conteo de un mayor número de hot spots no proporciona un valor final de angiogénesis más representativo.

El conteo de microvasos fue realizado por un único investigador, sin conocimiento de los datos clínicos de los pacientes. De esta forma se individualizaron los datos angiogénicos y los datos clínicos, para minimizar las variables que pudieran contaminar los resultados del estudio.



**Figura 39.** Ejemplo de conteo vascular en marcaje con CD31 en caso de carcinoma epidermoide de lengua de la muestra del estudio (Magnificación x100 y x400).





**Figura 40.** Ejemplo de conteo vascular en marcaje con CD105 en caso de carcinoma epidermoide de lengua de la muestra del estudio (Magnificación x100 y x400).

### 3.2.3. Metodología del estudio clínico

Se recogen datos de forma retrospectiva del historial clínico de los pacientes seleccionados, y se realiza un control de su estado en Abril de 2004, momento en el que se censuran los casos que todavía sobreviven.

#### Datos personales

Se recogen datos de filiación del paciente, número de historia clínica del Complejo Hospitalario Juan Canalejo, nombre y apellidos de los pacientes, que se registran con iniciales para preservar su intimidad y proteger su identificación. También se recoge edad del paciente, y se registra la que tiene en el momento de realizarse la cirugía.

El sexo se registra como (1) si es varón y (2) si es mujer.

Los hábitos de tabaco y alcohol se recogen como (1) si el paciente tiene ese hábito, y (2) si no lo tiene.

Número historia clínica	
Nombre y apellidos (Iniciales)	
Edad	
Sexo	(1) Varón (2) Hembra
Hábito tabáquico	(1) Fumador (2) No fumador
Hábito alcohólico	(1) Bebedor (2) No bebedor

**Datos clínicos**

En este apartado se recogen datos de localización del tumor primario, y su ubicación con respecto a la lengua. Se etiquetan como (1) aquellos tumores primarios localizados en la lengua móvil, como (2) los tumores localizados en la base de lengua, y como (3) aquellos tumores que afectan localizaciones más allá de la lengua o que en su infiltración afectan a la lengua. Se etiqueta a efectos de facilitar la nomenclatura como "lengua ampliada".

Se recoge también la clasificación TNM, siguiendo los parámetros de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) del año 2002, que es la clasificación por estadios vigente en la actualidad.

Localización tumor primario	(1) Lengua móvil (2) Base de lengua (3) Lengua ampliada
T	(1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4
N	(1) N0



	(2) N1
	(3) N2a
	(4) N2b
	(5) N2c
	(6) N3

**Datos quirúrgicos**

Se recoge la fecha de la cirugía, y se computa como el día 0 a partir del cual se contará el tiempo de evolución y seguimiento del paciente. Estos tiempos se cuantifican en meses.

Se recoge asimismo el procedimiento quirúrgico sobre la lesión primaria, con consideración hacia la actitud terapéutica con la lengua. De esta forma se etiqueta como (1) la realización de glosectomía parcial sin llegar a línea media, (2) hemiglosectomía, (3) glosectomía subtotal, (4) glosectomía total, (5) glosectomía ampliada, (6) laringoglosectomía y (7) los restantes procedimientos.

La realización de vaciamiento cervical de lado derecho y/ o izquierdo se recoge como (1) si no se realiza vaciamiento, (2) si se realiza vaciamiento funcional y (3) si el vaciamiento es radical. No se consideran las modificaciones del vaciamiento funcional.

Fecha cirugía	
Procedimiento quirúrgico	(1) Glosectomía parcial (2) Hemiglosectomía (3) Glosectomía subtotal (4) Glosectomía total (5) Glosectomía ampliada (6) Laringoglosectomía (7) Otros
Vaciamiento cervical derecho	(1) No (2) Vaciamiento funcional (3) Vaciamiento radical

Vaciamiento cervical izquierdo	(1) No
	(2) Vaciamiento funcional
	(3) Vaciamiento radical

### Datos de terapias complementarias

Se recoge la realización de radioterapia complementaria. Cuando el tratamiento quirúrgico del primario se había completado con radioterapia se registró como (1), y como (2) cuando no se realizó.

Radioterapia complementaria	(1) Sí
	(2) No

### Recidiva

Se registra como (1) la presencia de recidiva tumoral, y como (2) la ausencia de recidiva. Asimismo se recoge la localización de la recidiva, codificando como (0) la ausencia de recidiva, (1) la presencia de recidiva local, (2) la exsitencia de recidiva regional, y (3) el hallazgo de recidiva a distancia. Por recidiva local se entiende la presencia de recidiva tumoral en localización primaria. La recidiva regional se refiere a la presencia de adenopatías cervicales metastásicas posteriores al tratamiento. La recidiva a distancia se refiere a la aparición de metástasis sistémicas.

El tratamiento de la recidiva se registró como (0) cuando no se realizó tratamiento, (1) cuando el tratamiento fue paliativo, y (2) cuando se realizó tratamiento con fines curativos.

El tipo de tratamiento de la recidiva se recogió como (0) cuando no se realizó tratamiento, (1) cuando se realizó tratamiento quirúrgico, (2) cuando se realizó tratamiento de rescate con radioterapia, y (3) en los casos que el tratamiento de la recidiva se realizó mediante quimioterapia.



Recidiva	(1) Sí (2) No
Localización recidiva	(0) No (1) Local (2) Regional (3) Distancia
Tratamiento recidiva	(0) No (1) Paliativo (2) Curativo
Tipo de tratamiento de recidiva	(0) No (1) Cirugía (2) Radioterapia (3) Quimioterapia

### Seguimiento clínico

Se ha anotado el tiempo en meses libre de enfermedad, hasta que el paciente desarrolló una recidiva o hasta que el caso fue censurado en Abril de 2004, contabilizando desde la fecha de la intervención quirúrgica. Para situar la recidiva en el tiempo se emplea la fecha en la que al paciente se le diagnostica la recidiva, y no desde que el paciente refiere una evolución anormal.

También se ha registrado la supervivencia global en meses. Para ello se contabiliza desde la fecha de tratamiento quirúrgico hasta el momento del fallecimiento, o hasta que el caso fue censurado en Abril de 2004.

Por último se han diferenciado los pacientes que han fallecido, etiquetados como (1), de los que no han fallecido, registrados como (2).

Tiempo libre de enfermedad	Meses
Supervivencia global	Meses
Fallecimiento	(1) Sí (2) No

### **Datos adicionales de interés**

Se abre un apartado de "Observaciones" para registro de datos adicionales que pudieran resultar de interés para el estudio y que no han sido registrados en los apartados anteriores.

### **3.2.4. Metodología del estudio histológico e inmunológico**

Los datos histológicos se obtuvieron de los informes proporcionados por el servicio de Anatomía Patológica, para la valoración del pronóstico y orientación de la necesidad de realizar tratamientos complementarios. No obstante, las biopsias fueron reevaluadas por un patólogo que procedió a tallar cortes de la pieza, tinción convencional con hematoxilina-eosina y estudio histológico convencional. Este estudio fue comparado con el informe previo de anatomía patológica.

Al mismo tiempo se realizaron las tinciones inmunológicas con CD31 y CD105, de la forma previamente descrita.



### 3.3. METODO ESTADISTICO

Con los datos recogidos se confeccionó una base de datos en el programa Access para el análisis estadístico. Algunas variables fueron recodificadas para adaptar la base de datos al programa informático empleado para el estudio estadístico.

Los datos obtenidos de la base de datos creada se procesaron con el programa estadístico SPSS 12.0. Mediante este programa los datos fueron evaluados utilizando la estadística básica, análisis bivariantes y análisis multivariantes.

Para la comparación de medias para 2 grupos de variables, una cuantitativa y otra cualitativa dicotómica, se ha empleado la t de Student y la prueba de Mann-Whitney. Asimismo algunos análisis estadísticos se han realizado con el test de la mediana. Para la comparación de variables cualitativas se emplearon las tablas de contingencia (Chi-cuadrado).

La supervivencia de la serie se analizó desde las curvas de Kaplan y Meier, tanto para la supervivencia global como para la supervivencia causa-específica, periodo libre de enfermedad y recidiva local. Estas cifras se compararon con los parámetros pronósticos obtenidos tanto de la patología como de la inmunología.

El impacto sobre la supervivencia de las distintas variables con relación al tiempo se analizó mediante el test de regresión de Cox.

# **CAPITULO IV**

## **RESULTADOS**



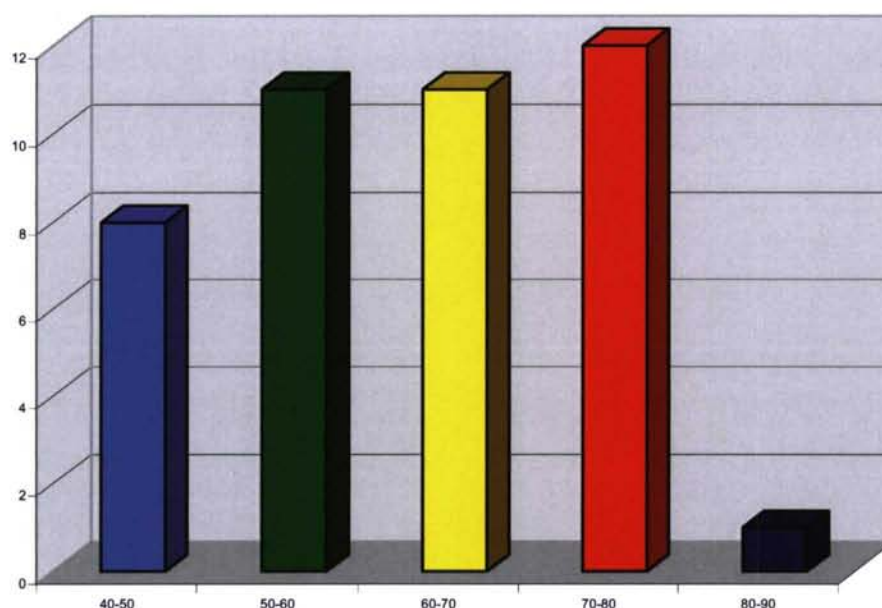
## 4.1. DATOS EPIDEMIOLOGICOS

### 4.1.1. Edad y sexo

La muestra de 43 pacientes corresponde a 36 varones (83.72%) y 7 mujeres (16.28%).

La edad de los pacientes osciló entre 40 y 83 años, con una media de 61.56 años.

La distribución por décadas se puede observar en la gráfica de la figura 41:



**Figura 41.** Distribución por décadas de la edad de aparición del cáncer en los pacientes incluidos en el estudio.

La edad media de los varones incluidos en el estudio resultó 59.89 años, con un rango variable de 40 a 78 años. En las mujeres, la edad media fue 70.14 años, con un rango de 53 a 83 años.

### 4.1.2. Tabaco y alcohol

El 83.72% de los pacientes, un total de 36, son o han sido fumadores. Los restantes 7 pacientes (16.28%) refirieron no haber fumado en ninguna ocasión.

Respecto al hábito alcohólico, 35 pacientes (81.39%) refirieron ser consumidores habituales de alcohol, y 8 (18.61%) pacientes negaron dicho hábito.

Treinta y cinco pacientes (81.39%) reconocieron los hábitos tabáquico y alcohólico como cofactores implicados en la etiología neoplásica. Otros 7 pacientes (16.28%) negaron ser fumadores ni bebedores habituales. Un paciente (2.33%) reconoció ser fumador y no bebedor.

Seis de las 7 mujeres incluidas en el estudio (85.71%) refirieron que no eran consumidoras habituales de tabaco ni de alcohol. Tan solo una paciente (14.29%) fue registrada como fumadora y bebedora.

Por el contrario, entre la población masculina de la muestra, 34 de los 36 varones (94.44%) reconocieron consumo habitual de tabaco y alcohol, y 1 paciente (2.78%) reconoció exclusivamente el consumo de tabaco y no de alcohol.

### 4.1.3. Estadíaje

La localización del tumor primario, de acuerdo a la nomenclatura previamente descrita, fue la siguiente:

(1) Lengua móvil	11 pacientes	25.58%
(2) Base de lengua	13 pacientes	30.23%
(3) Lengua ampliada	19 pacientes	44.19%

La distribución de la muestra global según la lesión primaria (T) en la clasificación TNM de la AJCC fue la siguiente:

T1	8 pacientes	18.60%
T2	20 pacientes	46.51%



T3	5 pacientes	11.63%
T4	10 pacientes	23.26%

La distribución de pacientes según su afectación ganglionar cervical (N) fue la siguiente:

N0	23 pacientes	53.49%
N1	2 pacientes	4.65%
N2a	1 paciente	2.33%
N2b	12 pacientes	27.91%
N2c	3 pacientes	6.98%
N3	2 pacientes	4.65%

De estos datos podemos establecer una división de la muestra en dos grupos según el factor N, de reconocido interés pronóstico: 23 pacientes de la muestra (53.49%) son N0, mientras que 20 pacientes (46.51%) son N+.

N0	23 pacientes	53.49%
N+	20 pacientes	46.51%

#### 4.1.4. Tratamientos realizados

De acuerdo con la nomenclatura de procedimientos quirúrgicos empleada en el estudio, la distribución de técnicas quirúrgicas realizadas sobre las lesiones primarias fue la siguiente:

(1) Glosectomía parcial	5 pacientes	11.63%
(2) Hemiglosectomía	14 pacientes	32.56%
(3) Glosectomía subtotal	2 pacientes	4.65%
(4) Glosectomía total	0 pacientes	0%
(5) Glosectomía ampliada	18 pacientes	41.86%

(6) Laringoglossectomía	2 pacientes	4.65%
(7) Otras	2 pacientes	4.65%

Destaca la ausencia de casos de glossectomía total. En realidad, esta cifra no es real, sino que probablemente corresponda a que dichas glossectomías totales han ido asociadas a otros procedimientos que han determinado su inclusión dentro de los epígrafes "glossectomía ampliada" o "laringoglossectomía".

Respecto al manejo terapéutico del cuello, los tratamientos realizados han sido los siguientes:

No tratamiento quirúrgico	1 paciente	2.33%
Vaciamiento funcional ipsilateral	28 pacientes	65.12%
Vaciamiento funcional bilateral	11 pacientes	25.58%
Vaciamiento radical unilateral	1 paciente	2.33%
Vaciamiento radical + funcional	2 pacientes	4.65%

En 26 pacientes (60.46%) se realizó radioterapia complementaria postoperatoria. Los criterios para la administración de Radioterapia adyuvante fueron los aceptados internacionalmente por la comunidad científica:

1. Presencia de bordes quirúrgicos infiltrados.
2. Tamaño tumoral primario superior a 4 cm, o con invasión de estructuras anatómicas adyacentes (Estadío T superior a T2).
3. Dos o más ganglios regionales afectados por carcinoma epidermoide.
4. Infiltración extracapsular en algún ganglio infiltrado.

De los 26 pacientes radiados, los motivos que determinaron la realización de radioterapia adyuvante se muestran en la siguiente tabla:

Infiltración cervical (N+)	16 pacientes	61.54%
Estadío T superior a T2	13 pacientes	50%
Proximidad del margen de lesión primaria	4 pacientes	15.38%



Algunos de los pacientes incluídos en el programa de radioterapia complementaria presentan más de uno de los criterios de inclusión. Por ello, la suma de porcentajes de los tres grupos de la tabla no coincide con el 100%.

#### **4.1.5. Recidiva**

De los 43 pacientes estudiados, 35 (81.39%) presentaron recidiva: en 16 casos la recidiva fue local (45.71% de los pacientes recidivados), en 11 casos (31.43%) fue regional, y en 8 casos (22.86%) fue a distancia.

De los 35 casos recidivados, 11 no recibieron tratamiento (31.43%), 6 recibieron tratamiento paliativo (17.14%), y 18 recibieron tratamiento con intención curativa (51.43%).

De los 6 pacientes que recibieron tratamiento paliativo, 2 recibieron radioterapia (33.33%) y 5 quimioterapia (83.33%).

Dieciocho pacientes con recidiva recibieron tratamiento con fines curativos. El 100% fueron tratados quirúrgicamente, y 4 de ellos (22.22%) recibieron radioterapia complementaria.

#### **4.1.6. Supervivencia**

##### **Supervivencia global**

La supervivencia de cada paciente fue determinada en meses desde el momento del tratamiento quirúrgico hasta el cierre del seguimiento o el éxitus del paciente.

Dado que la causa de fallecimiento de todos los pacientes en el grupo de éxitus fue la propia enfermedad, no consideraremos la diferencia entre supervivencia global y causa-específica.

La supervivencia media de la muestra de pacientes fue de 62.47 meses, con un rango de 4 a 125 meses.

### **Periodo libre de enfermedad**

Se calcula en meses desde el momento de la cirugía hasta la aparición de recidiva o el cierre del estudio.

El periodo medio libre de enfermedad se calculó en 44.70 meses, con un rango de variabilidad que osciló entre 3 y 119 meses.

Entre el grupo de pacientes que no sufrió recidiva tumoral, el periodo libre de enfermedad se calculó hasta el momento del estudio o el éxito por otra causa, y la media obtenida fue de 108 meses, con un rango de 98 a 119 meses.

Entre los pacientes que sufrieron recidiva, el periodo libre de enfermedad representa el tiempo que tardó en aparecer la recidiva. Se obtuvo una media de 30.23 meses, con un rango variable de 3 a 115 meses.

### **Exitus**

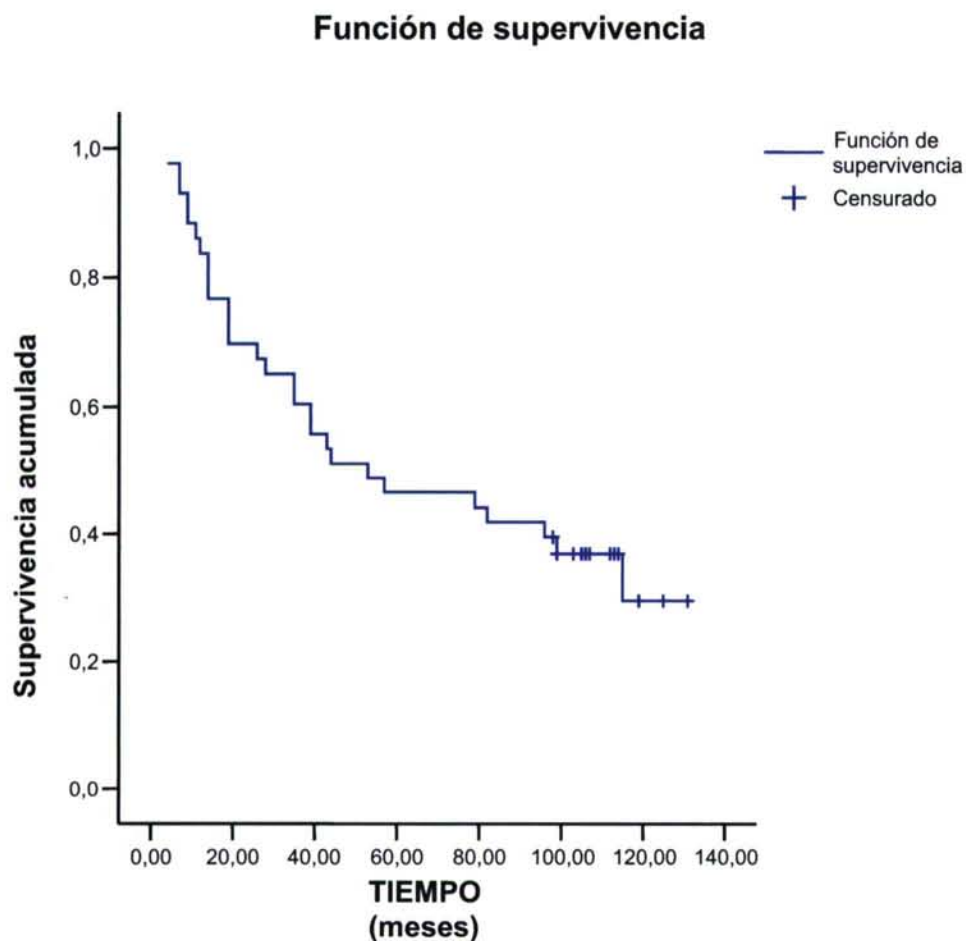
De los pacientes incluidos en el estudio, 28 fueron éxito motivado por la neoplasia (65.12%), mientras que 15 permanecían vivos en el momento del cierre del estudio (34.88%). Dado que no se contabilizó ningún paciente que fuera éxito por causas diferentes a la enfermedad estudiada, la supervivencia global coincide con la supervivencia causa-específica. En adelante, nos referiremos como supervivencia global a la hora de calificar este dato.

Siete de los 35 pacientes con recidiva tumoral (20% de ellos) permanecían vivos al cierre del estudio.

### **Curvas acumuladas de supervivencia global**

Se calcularon las curvas acumuladas de supervivencia global según el método de Kaplan-Meier, y se obtuvo la siguiente gráfica:



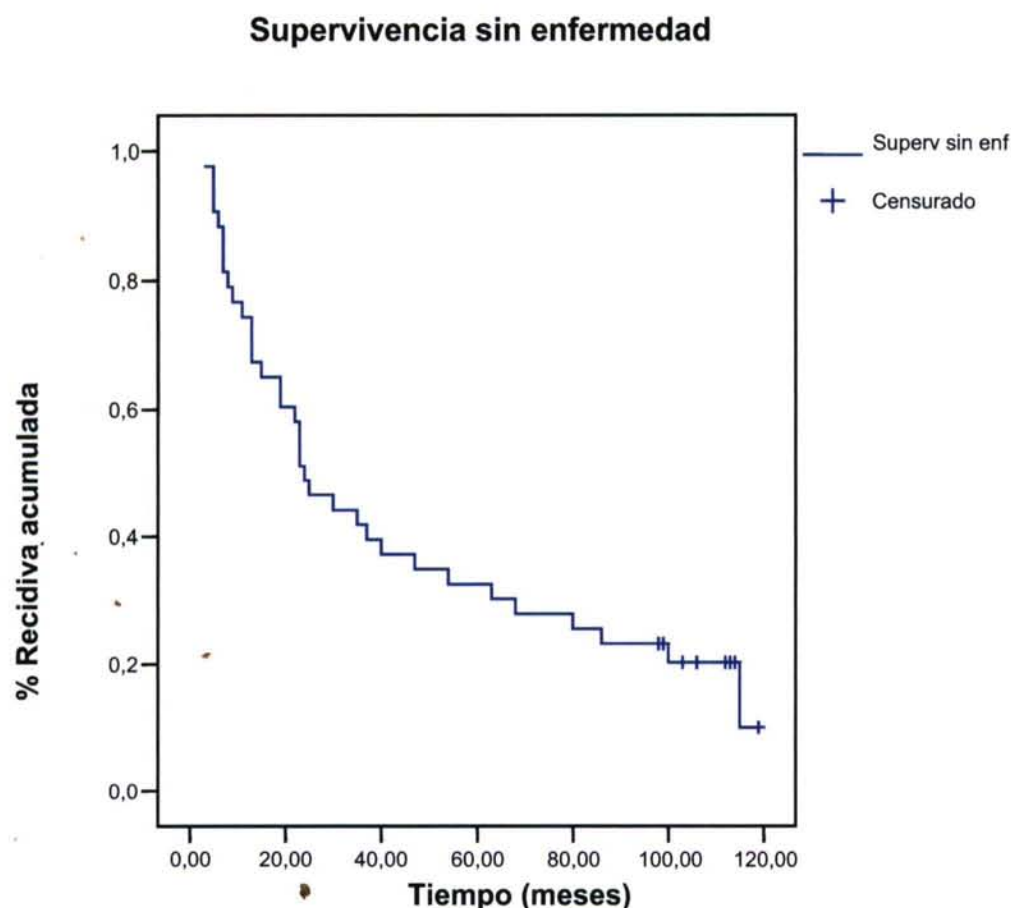


**Figura 42.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia global de la muestra del estudio.

En esta curva se puede observar que la mayor parte de los fallecimientos acontecen en los primeros 40 meses, y que la curva no se horizontaliza en ningún momento.

### Curvas acumuladas de recidiva

Se calcularon las curvas acumuladas de aparición de recidivas según el método de Kaplan-Meier, y se obtuvo la siguiente gráfica:



**Figura 43.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad de la muestra del estudio.

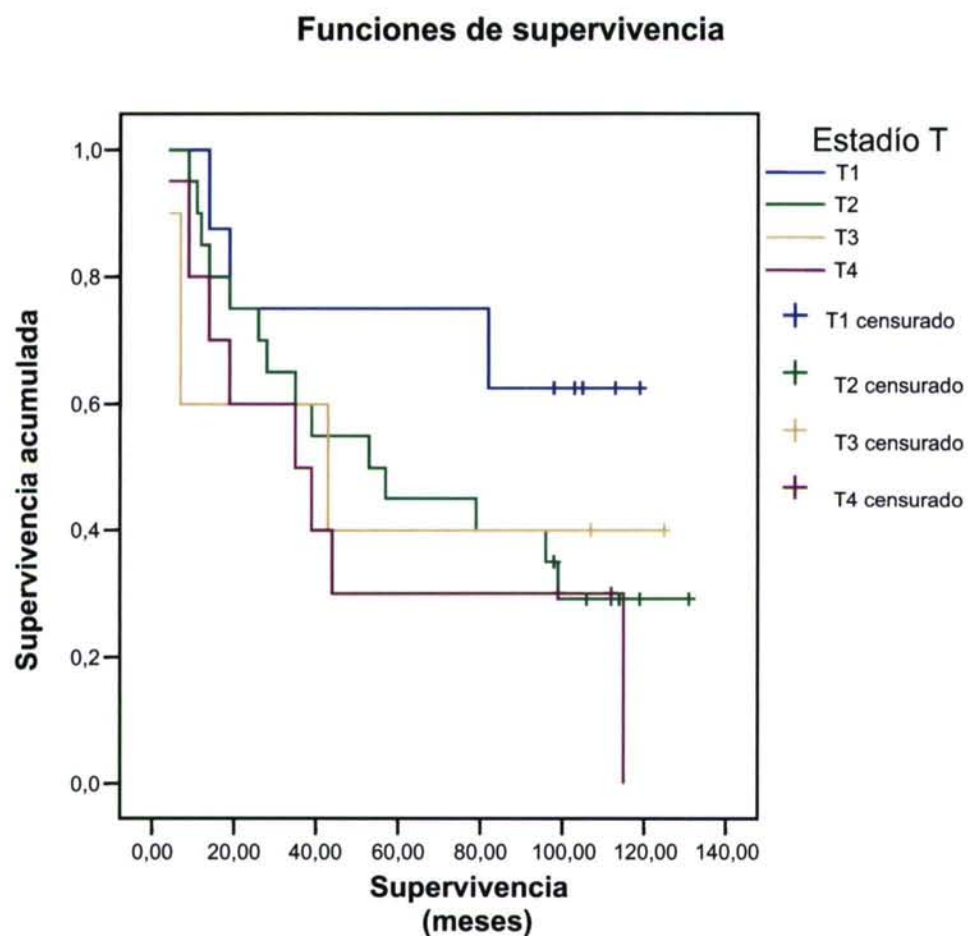
En esta gráfica se puede observar que la mayor parte de las recidivas aparecen en los primeros 25 meses, y que, aunque la tendencia de la curva se modifica a partir de los 25-40 meses, la curva tampoco se horizontaliza en su totalidad. Nótese que aparecen 2 casos de recidiva muy tardías: a los 100 y a los 115 meses, es decir al cabo de 8 y 9 años después del tratamiento quirúrgico.

Asimismo conviene destacar el elevado índice de recidiva tumoral acumulada que se encuentra en la muestra de pacientes (81.39%).



## Curvas acumuladas de supervivencia global en función del estadio T

Se calcularon las curvas acumuladas de supervivencia global en función del estadio T, según el método de Kaplan-Meier, y se obtuvo la siguiente gráfica:



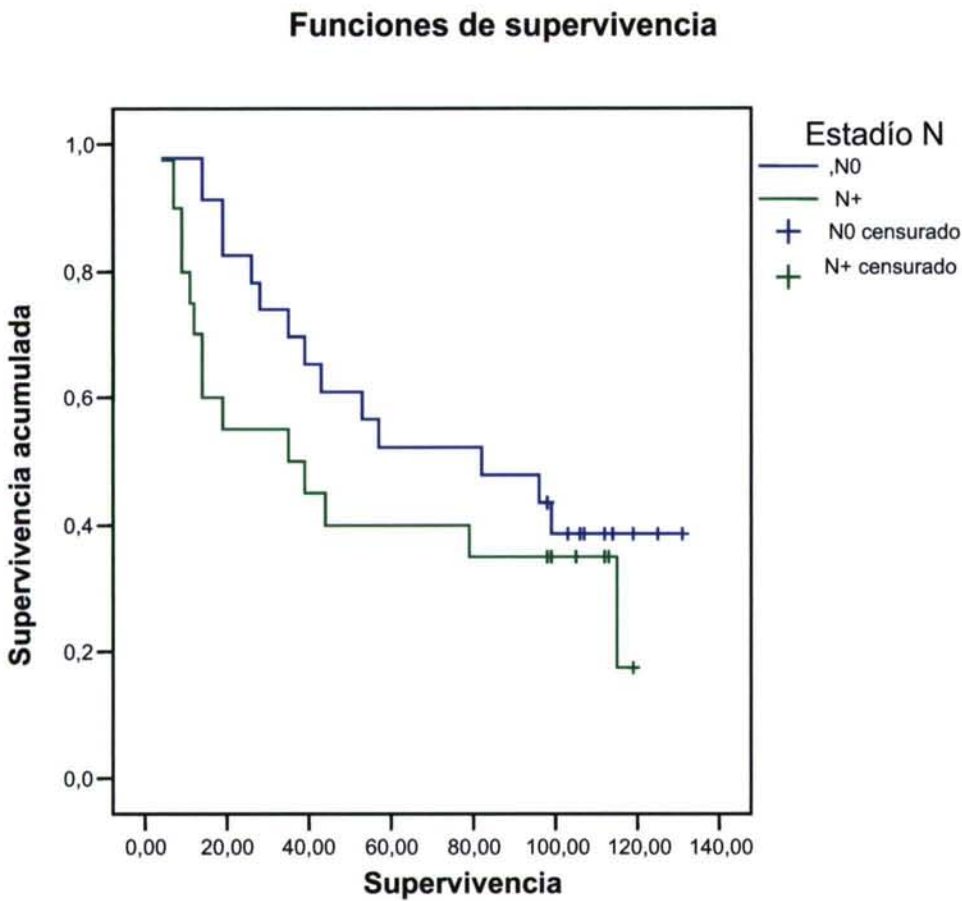
**Figura 44.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia acumulada en función del estadio T de la muestra del estudio.

En esta curva se puede observar la diferencia en cuanto a supervivencia del T1 con respecto al resto de los estadios T. Por tanto, los tumores menores de 2 cm presentan mejores cifras de supervivencia acumulada que los tumores mayores de 2 cm.

También resulta destacable que ningún paciente con carcinoma epidermoide de lengua en estadio T4 respecto al tamaño tumoral ha sobrevivido en nuestro grupo de estudio.

**Curvas acumuladas de supervivencia en función del estadio N**

Se calcularon las curvas acumuladas de supervivencia global en función del estadio N, según el método de Kaplan-Meier, y se obtuvo la siguiente gráfica:



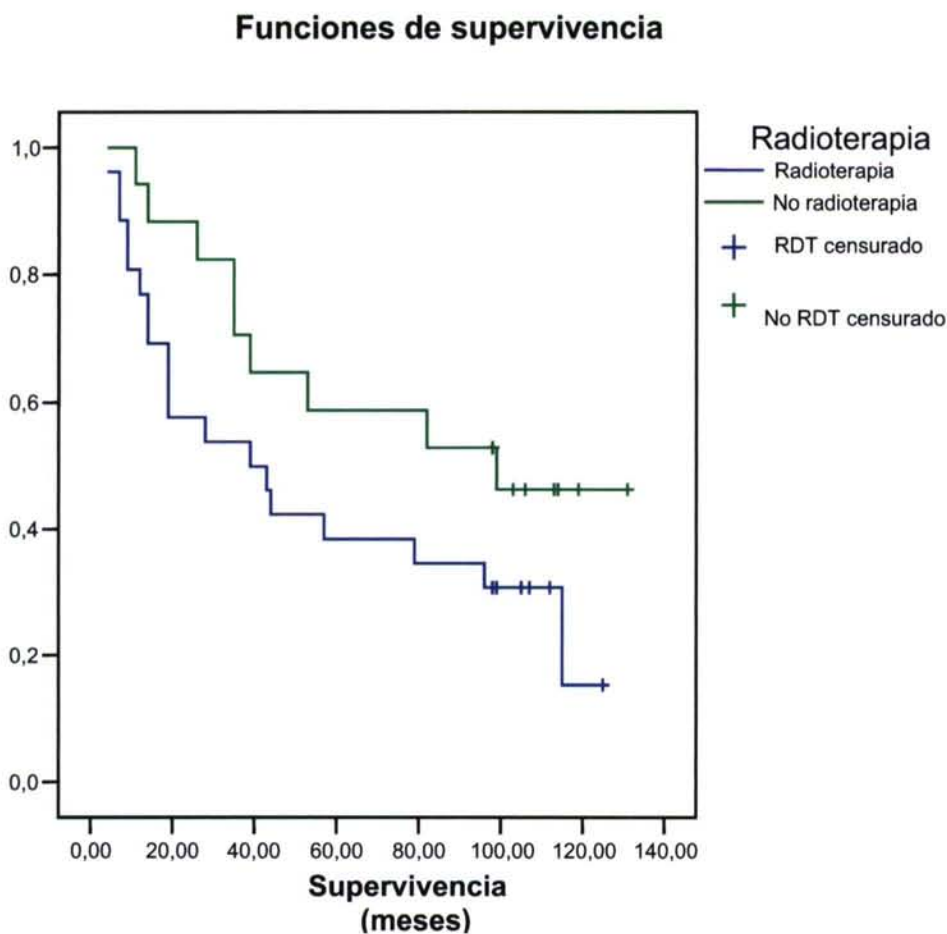
**Figura 45.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia acumulada en función del estadio N de la muestra del estudio.

En esta gráfica se aprecia el escaso impacto en la supervivencia del estado del cuello en nuestra serie.



### Curvas acumuladas de supervivencia en función del tratamiento radioterápico complementario

Se calcularon las curvas acumuladas de supervivencia global en función del tratamiento radioterápico complementario, según el método de Kaplan-Meier, y se obtuvo la siguiente gráfica

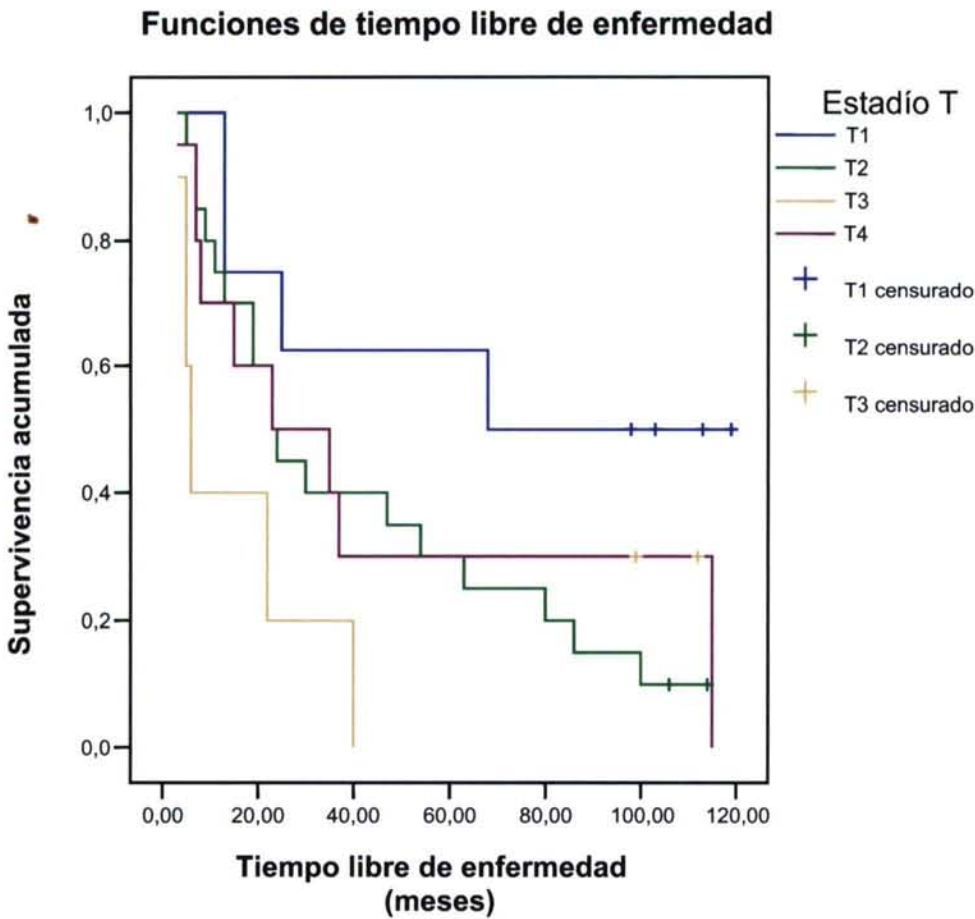


**Figura 46.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia acumulada en función del tratamiento radioterápico complementario de la muestra del estudio.

En la gráfica se puede observar que los pacientes radiados tienen menor supervivencia global acumulada que los pacientes no radiados. Este dato se interpreta como que los pacientes que recibieron radioterapia presentaban un estadio tumoral más avanzado, y por tanto de peor pronóstico, que los pacientes no radiados.

**Curvas acumuladas de supervivencia libre de enfermedad en función del estadio T**

Se calcularon las curvas acumuladas de tiempo libre de enfermedad, hasta la aparición de recidiva, en función del estadio T, según el método de Kaplan-Meier, y se obtuvo la siguiente gráfica:



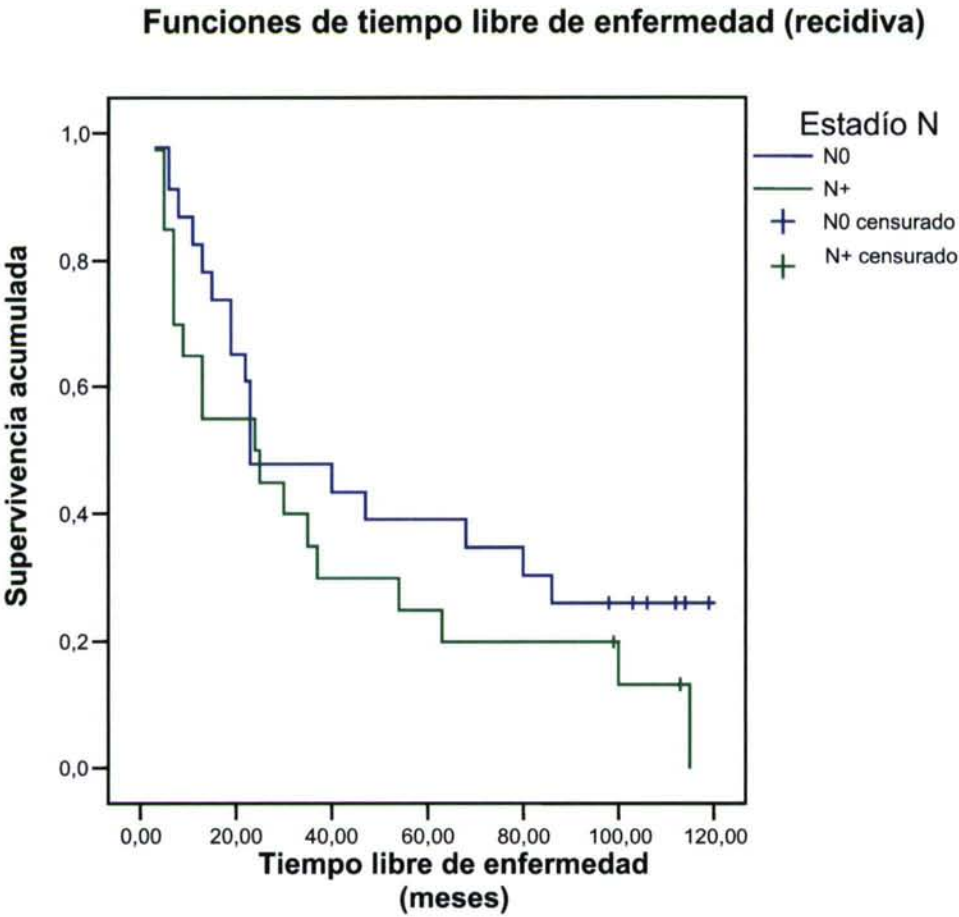
**Figura 47.** Curva de Kaplan-Meier de tiempo acumulado libre de enfermedad en función del estadio T de la muestra del estudio.

Se aprecia en el gráfico la diferencia en lo que respecta a la recidiva tumoral entre los tumores T1 y los demás.



**Curvas acumuladas de supervivencia libre de enfermedad en función del estadio N**

Se calcularon las curvas acumuladas de tiempo libre de enfermedad, hasta la aparición de recidiva, en función del estadio N, según el método de Kaplan-Meier, y se obtuvo la siguiente gráfica:



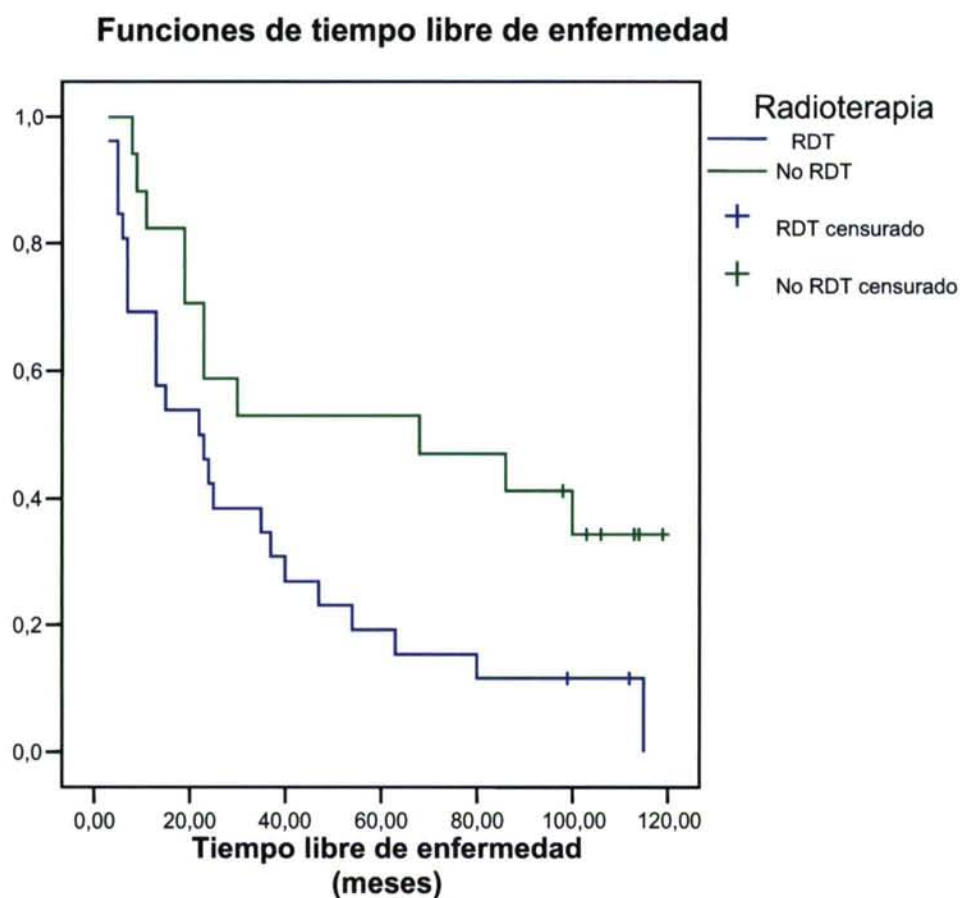
**Figura 48.** Curva de Kaplan-Meier de tiempo acumulado libre de enfermedad en función del estadio N de la muestra del estudio.

Se observa en la gráfica que la mayor parte de las recidivas tienen lugar en los primeros 25 a 40 meses, y luego se observa una tendencia hacia la horizontalización de la curva. Al igual que ocurre con la supervivencia global, la

supervivencia acumulada libre de enfermedad no muestra grandes diferencias con respecto al estadio N.

### Curvas acumuladas de supervivencia libre de enfermedad en función del tratamiento radioterápico

Se calcularon las curvas acumuladas de tiempo libre de enfermedad, hasta la aparición de recidiva, en función del tratamiento radioterápico complementario, según el método de Kaplan-Meier, y se obtuvo la siguiente gráfica:



**Figura 49.** Curva de Kaplan-Meier de tiempo acumulado libre de enfermedad en función del tratamiento radioterápico complementario de la muestra del estudio.



La gráfica muestra que los pacientes no radiados presentan menos recidiva que los pacientes radiados. Este dato se debe interpretar como que los pacientes no radiados tienen un estadio más precoz de la enfermedad y, por tanto, mejor pronóstico que los pacientes radiados con estadios tumorales más avanzados.

Por su parte, la curva de supervivencia acumulada libre de enfermedad se horizontaliza antes en pacientes no radiados que en pacientes radiados.

## 4.2. MARCAJE INMUNOHISTOLÓGICO CON CD31 Y ENDOGLINA

El marcaje vascular mediante CD31 y CD105 ha sido realizado a diferentes diluciones. Para homogeneizar el estudio se ha seleccionado la dilución de CSA 1.500 para el CD105 y de CSA 1:40 para el CD31, siguiendo las recomendaciones del proveedor. El conteo se realizó, tal como hemos descrito previamente, en campos microscópicos de 100 y de 400 aumentos. Se descartó el conteo con CD31 a 100 aumentos por no ser valorable dado el elevado número de vasos, y no ser de interés al no contar con otras series de referencia con las que comparar nuestros datos que hayan empleado este aumento. Asimismo, se clasificó la intensidad de la tinción en categorías de 1 a 3, en sentido ascendente de intensidad. Dicho dato fue posteriormente desechado para análisis estadístico, una vez detectado que no aportaba ninguna información adicional de relevancia.

Los resultados obtenidos del conteo de las muestras histológicas se presentan en la tabla 5.

En el estudio global de la muestra, sin parcelación de la misma por variables cualitativas, se han encontrado los siguientes promedios de conteo vascular con diferentes tinciones:

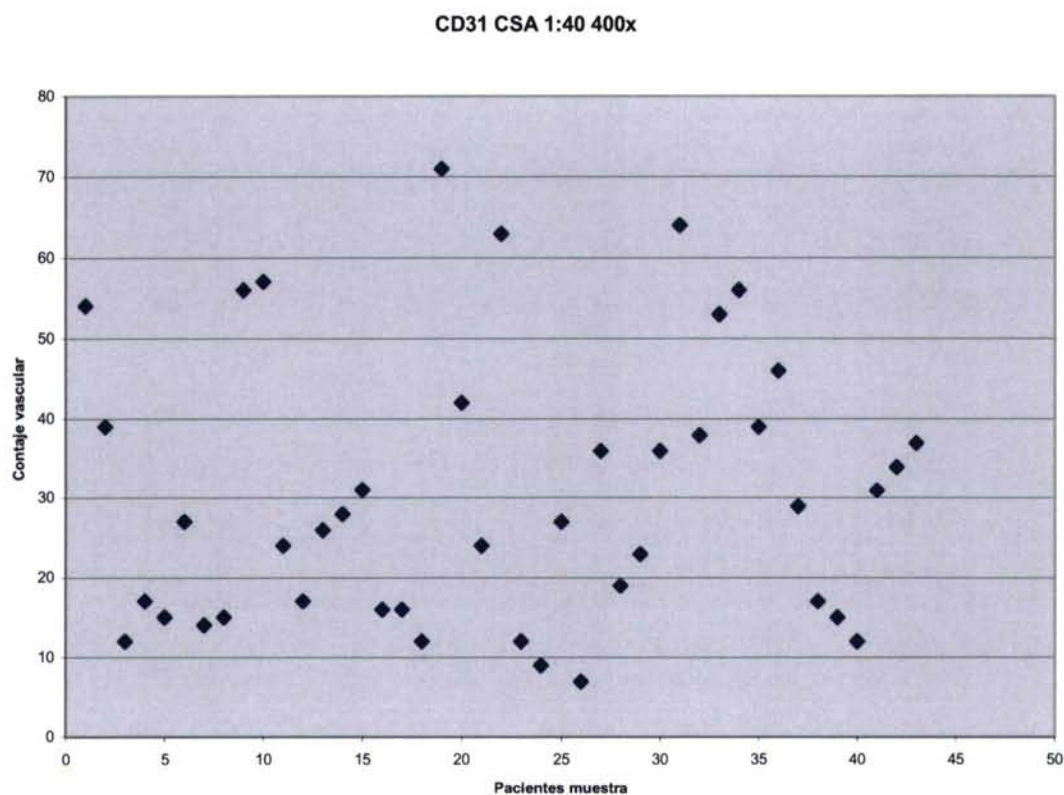
CD31 csa 1:40 400x	30.60 vasos
CD105 csa 1:500 100x	15.56 vasos
CD 105 csa 1:500 400x	7.02 vasos



Id	Biopsia	CD31 CSA 1:40 400x	Intensidad CD31	CD105 CSA 1:500 100x	CD105 CSA 1:500 400x	Intensidad CD105
1	B94-2184T	54	3	17	8	1
2	B94-2729T	39	3	9	5	1
3	B94-4168	12	2	7	5	1
4	B94-3767	17	3	12	5	2
5	B94-4400	15	2	9	7	1
6	B02-19260	27	2	33	6	2
7	B94-3918	14	2	10	7	1
8	B94-2625	15	2	3	1	1
9	B95-4731T	56	3	20	6	3
10	B96-770T	57	3	39	12	3
11	B94-3621T	24	3	13	11	1
12	B96-551T	17	2	15	4	2
13	B93-6850	26	3	9	3	2
14	B95-1219	28	2	4	1	1
15	B94-4574	31	2	3	2	1
16	B95-197	16	2	6	5	2
17	B94-1009	16	2	8	5	1
18	B94-4567	12	2	10	4	1
19	B95-3038	71	3	59	17	2
20	B95-3244T	42	2	17	8	3
21	B93-9063	24	3	11	5	2
22	B96-10701	63	2	47	14	2
23	B95-2240	12	2	9	5	2
24	B94-2194	9	3	6	4	1
25	B95-1449	27	2	14	4	1
26	B95-2300	7	2	4	3	1
27	B95-1823	36	3	2	2	1
28	B95-2263	19	2	15	5	1
29	B95-2557	23	3	7	5	1
30	B95-2951	36	1	16	9	2
31	B95-3431	64	3	43	31	3
32	B95-3798	38	3	4	2	1
33	B95-3607	53	3	26	15	3
34	B95-3406T	56	2	43	17	2
35	B95-3662	39	2	18	12	2
36	B93-3548	46	3	29	16	3
37	B03-1059	29	2	18	8	2
38	B95-4247T	17	2	4	2	2
39	B95-4308T	15	2	1	1	1
40	B96-31T	12	2	1	1	1
41	B96-4885	31	2	23	5	2
42	B94-2415	34	3	18	11	3
43	B95-4817	37	3	7	3	1

**Tabla 5.** Resultados obtenidos con el conteo vascular de las muestras histológicas teñidas con CD31 y CD105.

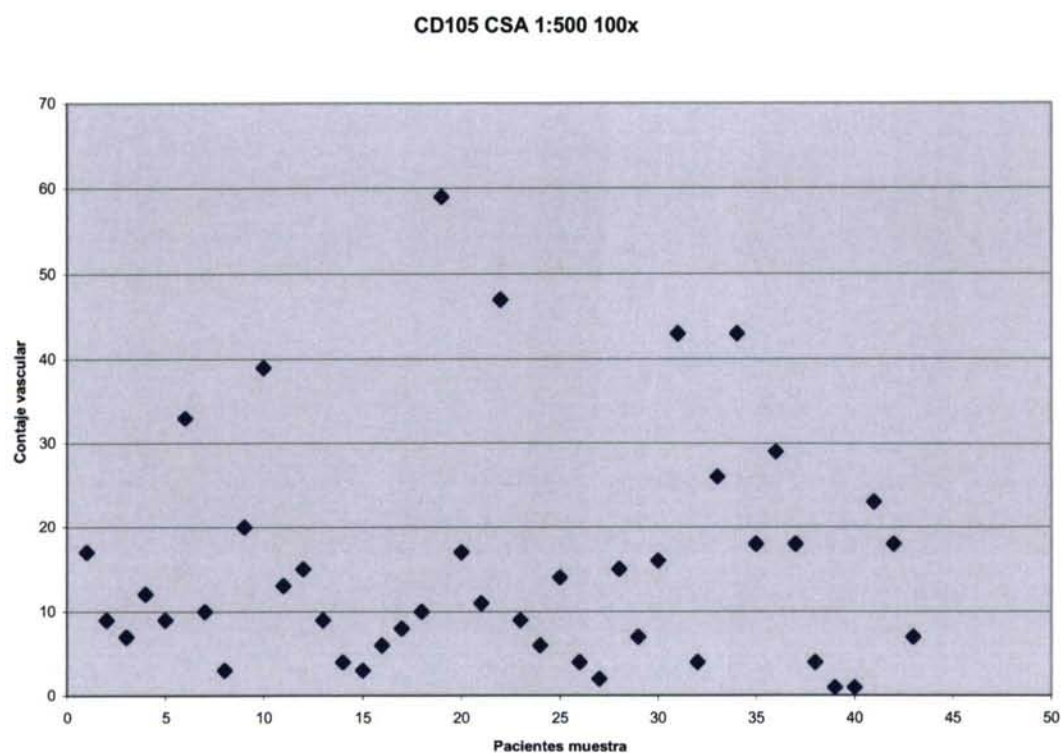
## Gráfica de conteaje de CD31 400x



**Figura 50.** Gráfica de dispersión del conteaje vascular con tinción de CD31 csa 1:40 400x.



## Gráfica de conteaje de CD105 100x



**Figura 51.** Gráfica de dispersión del conteaje vascular con tinción de CD105 csa 1:500 100x.